

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CÓRDOBA

Facultad de Ciencias Químicas

**EFFECTO DEL ENVASE SOBRE LA ESTABILIDAD DE VITAMINA C EN
CARAMELLOS DE GELATINA**

**Tesis de la Facultad de Ciencias Químicas
de la Universidad Católica de Córdoba conforme
a los requisitos para obtener el título de Magister en Tecnología de
los Alimentos**

por

MANUEL ALEJANDRO VAZQUEZ

CÓRDOBA

2012

Director del Trabajo Final

Dr. Gabriel Raya Tonetti

Gte. Corporativo de Vinculación Tecnológica de Arcor

Co-Director del Trabajo Final

Maf. Pamela Bertoldo

Universidad Católica de Córdoba

Comisión del Trabajo Final

Mter. Graciela Pagani

Dr. Leandro Aimar

Mag. Mariano Zaragoza

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todas las personas que hicieron posible la realización de esta Tesis:

- Al Grupo Arcor por darme la oportunidad de cursar la Maestría en Tecnología de Alimentos y poder realizar esta Tesis.
- A mi esposa Cecilia por su incondicional apoyo.
- Al Dr. Gabriel Raya Tonetti por sus aportes, comentarios y sugerencias durante el desarrollo de esta investigación.
- A Maf. Pamela Bertoldo, mi Co-Director, por su predisposición y aportes brindados.
- Al Cesni, principalmente al Bioquímico Raúl Uicich por su aporte en la aplicación de la técnica de determinación de vitamina C.
- A mis compañeros de trabajo de Arcor por su aporte desinteresado. Principalmente quiero agradecer a mis compañeros de Candy y del Laboratorio Central de Golosinas de Arroyito.
- Al Lic. Cristian Casado, Ceproc, por su colaboración en la implementación de la técnica.

ÍNDICE GENERAL

Lista de abreviaturas	IX
Lista de figuras	XI
Lista de tablas	XIII
Resumen	XIV
Summary	XVI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES	2
2.1 Oxidantes y antioxidantes	2
2.1.1 Oxidantes y radicales libres	2
2.1.2 Antioxidantes y defensa contra oxidantes	6
2.2 Vitamina C	9
2.2.1 Reseña histórica	10
2.2.2 Producción industrial	11
2.2.3 Estructura y propiedades	12
2.2.4 Fuentes	13
2.2.5 Vitamina C y prevención de enfermedades	15
2.2.6 Estabilidad del AA en sistemas alimenticios	17
2.3 Alimentos fortificados	25
2.3.1 Situación nutricional	27
2.4 Envases	28
2.4.1 Propiedades de barrera	29
2.4.2 Materiales flexibles	34
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	41

4. OBJETIVOS	43
4.1 Objetivos generales	43
4.2 Objetivos específicos	43
5. MATERIALES Y MÉTODOS	44
5.1 Tipo de estudio	44
5.2 Materiales	44
a) Caramelo	44
b) Envases	45
c) Envasado	46
5.3 Muestreo y frecuencia de análisis	47
5.4 Facilidades disponibles	47
5.5 Determinación de la concentración del AA	48
a) Fundamento	48
b) Equipamiento	49
c) Reactivos para la determinación de AA	49
d) Soluciones	49
e) Valoración del estándar de indofenol	50
f) Preparación de la muestra	51
g) Sustancia interferencia	51
h) Determinación	51
6. RESULTADOS	54
7. DISCUSIÓN	58
8. CONCLUSIÓN	60
BIBLIOGRAFÍA	62
ANEXO I: FACILIDADES DISPONIBLES	69

ANEXO II: TÉCNICA PARA LA DETERMINACIÓN DE pH Y ACIDEZ EN JARABES	70
ANEXO III: TÉCNICA PARA LA DETERMINACIÓN DE HUMEDAD RELATIVA EN CARAMELOS	73
ANEXO IV: RESULTADOS DE LAS DETERMINACIONES DE AA	76

LISTA DE ABREVIATURAS

AA: Ácido ascórbico

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AOAC: *Association of Official Analytical Chemists*

ASTM: *American Society for Testing and Material*

BOPP: Polipropileno biorientado

CAA: Código Alimentario Argentino

CESNI: Centro de Estudios Sobre Nutrición Infantil

DHAA: Ácido dehidroascórbico (*Dehydroascorbic Acid*)

DKGA: Ácido dicetogulónico (*Diketogulonic Acid*)

EVOH: Etilvinil alcohol.

FAO: *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

FDA: *Food and Drug Administration*

FOSH: *Foods for Specific Health Use*

HR: Humedad relativa

ILSI: *International Life Sciences Institute*

IOM: *Institute Of Medicine*

IDR: Ingesta Diaria Recomendada

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

Med: medicina

mic: micrones

mg: miligramos

OTR: *oxygen transmission rate*

OMS: Organización Mundial de la Salud

PET: Polietilentereftalato

PE: Polietileno

PEBD: Polietileno de baja densidad

PVDC: Cloruro de polivinilideno

PUFAs: *polyunsaturated fatty acids*

UL: *Upper Limits*

WVTR: *water vapor transmission rate*

LISTA DE FIGURAS

1. Especies reactivas del oxígeno en organismos vivos	3
2. Daños generados por radicales libres en el organismo	4
3. Fuentes de radicales libres	5
4. Esquema de peroxidación lipídica	6
5. Estructura molecular del ácido L-ascórbico	12
6. Oxidación del ácido L-ascórbico	13
7. Degradación aeróbica del ácido ascórbico	18
8. Esquema general de los mecanismos de las degradaciones oxidativas y anaeróbicas del AA	19
9. Degradación de AA (X) en función de la temperatura y tiempo en néctar Cupuaçu	20
10. Difusión de un gas a través de una película plástica	29
11. Bolsa de tres costuras	34
12. Estructura bilaminar	35
13. Estructura del monómero del policloruro de vinilideno	35
14. Estructura molecular del monómero del polietileno de baja densidad	36
15. Estructura molecular del monómero del polipropileno	37
16. Estructura molecular del monómero del PET	37
17. Estructura molecular del monómero de las poliamidas	38
18. Envase de tres costuras con indicación de las zonas de sellado	47
19. Oxidación del ácido ascórbico	48
20. Reducción del 2,6-dicloroindofenol	49
21. Evolución del contenido de ácido ascórbico C_{AA} (mg/100g) en función del tiempo (días)	54
22. Variación del $\ln(C_{AA})$ vs tiempo durante los primeros 50 días	56

23. Variación del $\text{Ln}(C_{AA}-C_{AA\infty})$ vs tiempo durante los 365 días	57
---	----

LISTA DE TABLAS

I. Principales antioxidantes nutritivos y sus fuentes alimentarias	7
II. Contenido de vitamina C en alimentos	15
III. Parámetros cinéticos de la degradación del AA en el néctar Cupuaçu (18° Brix, pH 3,2) a 80°C	22
IV. Clasificación de diversos polímeros según sus propiedades de barrera al oxígeno	38
V. Permeabilidad al oxígeno y al vapor de agua de los principales polímeros	39
VI. Propiedades físico-químicas del caramelo de gelatina	45
VII. Propiedades de barrera de las diferentes alternativas de materiales de empaque y costos	46
VIII. Cinética de la degradación del AA con su correspondiente constante de velocidad	55

RESUMEN

En este trabajo se estudia la degradación del Ácido Ascórbico (AA) contenido en caramelos de gelatina fortificados en diferentes envases, polímeros, con variaciones en la permeabilidad al oxígeno y se evalúa la influencia de los factores externos en su concentración a lo largo de la vida útil del producto.

Los sistemas producto-envase se almacenaron bajo condiciones normales de temperatura y humedad por un período de 12 meses simulando las condiciones habituales de conservación del producto. La concentración del AA se determinó regularmente mediante una valoración con 2,6 dicloroindofenol, AOAC método oficial 967.21.

Los polímeros bilaminados utilizados para realizar este trabajo se enumeran a continuación:

- Polietilentereftalato (PET) sin cloruro de polivinilideno (PVDC) y polietileno (PE) blanco de baja densidad.
- PET con PVDC y PE blanco de baja densidad
- Polipropileno biorientado (BOPP) y PE blanco de baja densidad.

Durante el ensayo se evidenció una degradación del AA representada por una cinética reversible de primer orden con una estabilización de la concentración en un valor cercano al 50% de la concentración inicial de la vitamina a los 365 días posteriores al envasado. Las alternativas de los envases evaluados no presentan diferencias en los resultados de la concentración final de AA. A partir de los 50 días posteriores al envasado se observa una estabilización, este resultado evidenciaría la propiedad de barrera ejercida por los envases utilizados impidiendo la disponibilidad de oxígeno para la reacción de oxidación del AA.

Los resultados obtenidos en este trabajo permitirán seleccionar el material de empaque óptimo para el envasado del producto considerando

la vida útil y un menor costo del producto final debido al conocimiento de la cinética presenciada en la degradación del AA.

Palabras claves: ácido ascórbico, vida útil, permeabilidad al oxígeno, cinética.

SUMMARY

In this thesis the degradation of ascorbic acid (AA) contained in a fortified jelly candy in different packaging film materials, showing a different oxygen transmission rate (OTR), is studied in order to evaluate the influence of external factors in its concentration during the product shelf life.

The different samples product-packaging were stored under normal conditions of temperature and humidity for a period of 12 months simulating the standard storage conditions. The concentration of AA was evaluated regularly according to 2,6-dichloroindophenol titrimetric method, AOAC official method 967.21.

The bilaminated film materials used are the followings:

- Polyethylene terephthalate (PET) without polyvinylidene chloride (PVDC) and low density white polyethylene
- PET with PVDC and low density white polyethylene
- Bioriented Polypropylene (BOPP) and density white polyethylene

During the test there was an degradation of AA following a reversible first order kinetics with a concentration leveling off approximately equal to 50% of the initial concentration of the vitamin after 365 days of packaging. The alternatives of the evaluated film materials do not show differences in the results of the final concentration of AA. After 50 days of the packaging a leveling off could be observed, this result would show the barrier characteristics produced by the packaging used limiting the availability of oxygen for the oxidative reaction of AA.

The results of this test will allow the selection of optimal packaging material for the product taking into account the shelf life and a lower cost of the final product due to the kinetics observed in the degradation of AA.

Key words: ascorbic acid, shelf life, oxygen transmission rate, kinetics.

CAPÍTULO N° 1: INTRODUCCIÓN

Existe una relación directa entre una adecuada alimentación y un estado óptimo de salud del organismo, sin embargo en la actualidad el predominio de alimentos ricos en contenido de grasas y azúcares sobre los alimentos saludables (frutas y verduras) han ocasionado carencias en los niveles de consumo de nutrientes esenciales, principalmente en los niños.

Las innovaciones tecnológicas han permitido fortificar alimentos con nutrientes esenciales con la intención de contrarrestar la baja ingesta de los mismos. Como contrapartida, la concentración de estos nutrientes adicionados en los alimento es reducida a lo largo de la vida útil del producto por diferentes factores.

En este trabajo se estudia la degradación del AA contenido en caramelos de gelatina fortificados envasados en diferentes materiales de empaque, presentando distintos valores de permeabilidad a los gases, para evaluar la influencia de los factores externos en su concentración a lo largo de la vida útil del producto y así seleccionar la estructura de material de empaque adecuada.

CAPÍTULO N° 2: MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

2.1 Oxidantes y antioxidantes

El oxígeno es elemental para el desarrollo de la vida del hombre, sin él no podría vivir debido a que su principal función es la generación de energía. Paradójicamente este elemento está involucrado en reacciones de oxidación tóxicas para el organismo y por lo tanto es una constante amenaza. El cuerpo humano ha desarrollado a lo largo del tiempo mecanismos de defensas para mitigar estos efectos nocivos. Un mecanismo de defensa alternativo involucra a los antioxidantes nutritivos, moléculas de pequeño peso molecular presentes en nuestra dieta, como la vitamina E, vitamina C y los carotenoides.

2.1.1 Oxidantes y radicales libres

La mayoría de los efectos potencialmente dañinos del oxígeno, se encuentran asociados a la formación y actividad de especies reactivas del oxígeno (*International Life Sciences Institute Europe ILSI*, 1995). El término especies reactivas del oxígeno se aplica a las moléculas radicales y no radicales que son agentes oxidantes y/o son fácilmente convertidos a radicales libres. En organismos vivos es común la presencia de radicales libres o moléculas como el peróxido de hidrógeno, ozono, oxígeno singlete y el ácido hipocloroso, ver figura N° 1.

ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO EN ORGANISMOS VIVOS	
RADICALES LIBRES	NO RADICALES
Radical hidroxilo (HO^\bullet)	Peróxido de hidrogeno (H_2O_2)
Radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet -}$)	Oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$)
Radical óxido nítrico (NO^\bullet)	Ácido hipocloroso (HOCL)
Radical lípido peroxilo (LOO^\bullet)	Ozono (O_3)

Figura N° 1. Especies reactivas del oxígeno en organismos vivos (ILSI, 1995).

Los radicales libres son átomos o grupos de átomos con un electrón desapareado (el orbital posee solamente un electrón en lugar de dos, indicado en fórmula como \bullet), poseen una alta reactividad debido a que tienden a lograr la estabilidad electroquímica por la adición del electrón faltante. En este estado, deben ser inactivados para que su actividad química no dañe macromoléculas celulares como ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos y ácidos grasos poliinsaturados (*polyunsaturated fatty acids*, PUFAs). La exposición frecuente y sostenida a varios de estos efectos han sido vinculados con la aparición de enfermedades degenerativas (ILSI, 1995) por ejemplo, acción sobre proteínas que están involucradas en la generación de las cataratas, sobre el ácido desoxirribonucleico (ADN) en el cáncer, y las enfermedades degenerativas del sistema nervioso, tales como Parkinson y Alzheimer. Existe disponible una vasta evidencia científica que respalda la relación entre lipoproteínas oxidadas de bajo peso molecular y el proceso de aterosclerosis responsable de la enfermedad coronaria. Ver figura N° 2.

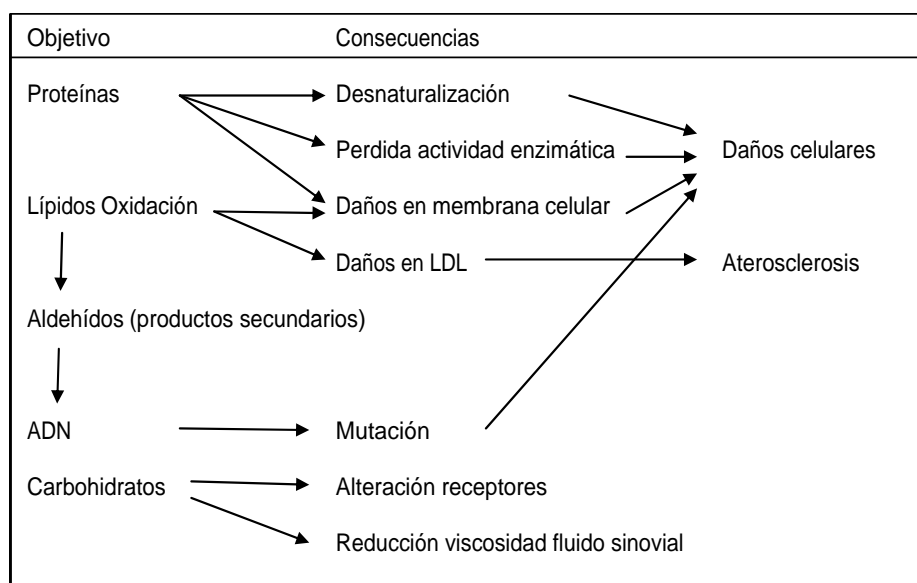


Figura N° 2. Daños generados por radicales libres en el organismo, adaptado (ILSI, 1995).

Las fuentes de radicales libres al organismo pueden provenir del medio ambiente exterior como también por el metabolismo normal del organismo, por ejemplo, en la reducción del oxígeno para la formación de agua se puede formar el radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxilo (HO^{\bullet}) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Además, el oxígeno molecular en su estado fundamental, puede ser excitado electrónicamente hacia el oxígeno molecular singlete (1O_2). Se pueden formar otras especies reactivas cuando el oxígeno se combina con otros átomos o moléculas como el radical alcohexilo (RO^{\bullet}), radical peróxilo (ROO^{\bullet}), óxido nítrico (NO^{\bullet}) entre otros (Fagali, 2011). Como fuentes externas que suministran radicales libres al organismo se pueden mencionar radiación, luz ultravioleta, ozono, pesticidas, entre otras. Ver figura N° 3.

RADICALES LIBRES: FUENTES	
INTERNAS	EXTERNAS
Mitocondrias	Humo cigarrillo
Fagocitos	Radiación
Reacciones con metales de transición	Luz ultravioleta
Ejercitación	Algunas drogas, pesticidas, solventes industriales
Inflamación	Ozono

Figura N° 3. Fuentes de radicales libres (ILSI, 1995)

Según Diplock, *Antioxidant Nutrients in Human Disease Prevention: State of the Art*, "el radical hidroxilo ($\text{HO}\bullet$) altamente reactivo, es responsable de la degradación de las células vivas mediante ataques sobre PUFAs generando radicales libres del ácido graso poliinsaturados los cuales conducen a la formación de radicales lípidos peróxilos. La inactivación de estos radicales es obtenida mediante la donación de un átomo de hidrógeno por parte de la vitamina E. La regeneración de la vitamina E puede realizarse mediante la acción de la vitamina C. Ante una deficiencia nutricional de vitaminas E y C, el radical lípido peroxilo puede actuar sobre otro PUFA y generar un nuevo PUFA radical. Originándose reacciones en cadena altamente dañinas para las células vivas (ILSI, 1996)".

En la figura N° 4, se esquematiza el proceso de peroxidación lipídica originada por la acción de radicales libres sobre ácidos grasos poliinsaturados y la intervención de los antioxidantes como inhibidores de las reacciones en cadena. La descomposición de los hidroperóxidos, principal producto de la reacción, es inducida por elevadas temperaturas o por metales de transición (iones de hierro y cobre) generando

hidrocarburos gaseosos y aldehídos (Buettner, 1993). Esta reacción de oxidación es factible de producirse en las membranas celulares debido al alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados.

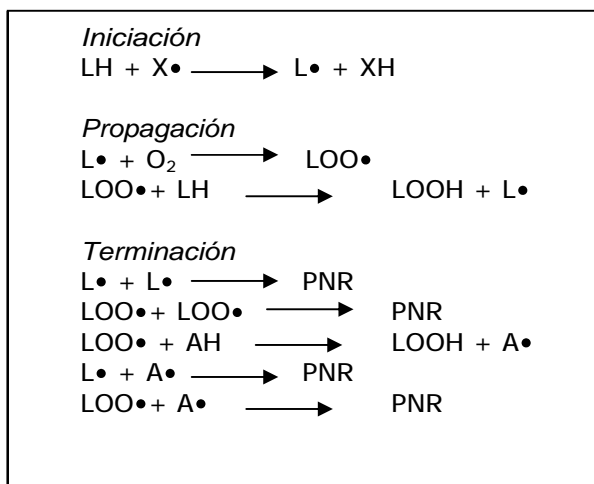


Figura N° 4. Esquema de peroxidación lipídica: LH: lípido, X•: radical libre iniciador, L•: radical lipídico, LOO•: radical peróxido, LOOH: hidroperóxido, AH: antioxidante, A•: radical libre del antioxidante, PNR: productos no radicales.

Es importante destacar que no siempre los radicales libres son perjudiciales para el organismo, ya que intervienen como mecanismos de defensa contra bacterias, hongos y virus (Curnutte y Babior, 1987).

La neutralización de los radicales libres se realiza a través de un antioxidante, el cual es capaz de neutralizar la acción oxidante mediante la liberación de electrones en sangre (Avello y Suwalsky, 2006).

2.1.2 Antioxidantes y defensa contra oxidantes

Los antioxidantes nutritivos más comunes son los carotenoides, la luteína, los licopenos, los tocoferoles (vitamina E) y la vitamina C presentes en gran cantidad de alimentos, en la tabla N° I se pueden ver las fuentes disponibles para los mismos. También existen los antioxidantes no nutritivos como los fenólicos, los cuales se encuentran disponibles en variedad de alimentos y con diferentes estructuras químicas: isoflavonas en frijoles, flavonoides en cítricos, quercetina en

cebolla y polifenoles en aceitunas. Se han encontrado algunos antioxidantes fenólicos en el té, café, manzana y vino tinto (ILSI, 1996).

Tabla N° I: Principales antioxidantes nutritivos y sus fuentes alimentarias (Avello y Suwalsky, 2006).

VITAMINA	FUENTE ALIMENTARIA
Vitamina E	<p><i>Fuentes más importantes</i></p> <p>Aceites vegetales, aceites de semillas prensadas en frío, germen de trigo y de maíz, almendras, avellanas, girasol, nuez, maní.</p> <p><i>Otras fuentes significativas</i></p> <p>Papas frescas, pimentón, palta, apio, repollo, frutas, pollo, pescado.</p>
Vitamina C	<p><i>Frutas</i></p> <p>Limón, lima, naranja, guayaba, mango, kiwi, frutilla, papaya, mora, piña.</p> <p><i>Verduras</i></p> <p>Tomate, verduras de hojas verdes (espinacas, perejil, hojas de rábano), repollo, coliflor, brócoli, pimentón, lechuga.</p>
Carotenoides	<p><i>Betacaroteno</i></p> <p>Verduras y frutas amarillas y anaranjadas, verduras verde oscuro.</p> <p><i>Alfacaroteno</i></p> <p>Zanahoria</p> <p><i>Licopeno</i></p> <p>Tomate</p> <p><i>Luteína y zexantina</i></p> <p>Verduras de hoja verde oscuro, brócoli.</p>

La investigación y el desarrollo se ha concentrado en vitamina E, vitamina C y carotenoides debido a que son nutrientes esenciales o precursores de los mismos y están presentes en cantidades significantes en los fluidos del cuerpo (ILSI, 1995). La vitamina C constituye el

antioxidante hidrosoluble más abundante en la sangre, mientras que la vitamina E es el antioxidante lipofílico mayoritario (Avello y Suwalsky, 2006).

Los antioxidantes nutritivos complementan los mecanismos de defensa del organismo debido a que la capacidad antioxidante celular está principalmente determinada por sistemas enzimáticos, mientras que las plasmáticas están asociadas a la concentración de antioxidantes de bajo peso molecular suplementados por la dieta (Avello y Suwalsky, 2006). Es recomendable mantener un adecuado balance entre las sustancias oxidantes y los sistemas antioxidantes con la finalidad de prevenir el estrés oxidativo. El incremento en la producción de oxidantes o una deficiencia en los sistemas de defensa alteran el equilibrio natural y generan condiciones propicias para la aparición de enfermedades asociados a un predominio de las sustancias oxidantes. Hay evidencia científica que respalda la relación entre la presencia de oxidantes en la generación de varias enfermedades degenerativas (Rice-Evan y Arif, 2002).

En el caso del cáncer, una de las posibles causas de su origen está relacionado con el daño originado por los oxidantes sobre el ADN, mecanismos enzimáticos pueden reparar los daños, pero si la célula se divide antes que su ADN fuera reparado, se genera una alteración genética permanente siendo el paso inicial para la carcinogénesis. Un elevado consumo de frutas y vegetales está asociado en la prevención contra algunos tipos de cáncer debido a que los mencionados alimentos son fuente de vitamina C y carotenoides.

La asociación entre agentes oxidantes y las enfermedades cardiovasculares, se basa en los daños generados en las arterias debido a la oxidación de lipoproteínas de bajo peso molecular (LDL) por radicales libres; la ingesta de vitamina E y C ha demostrado una reducción en el riesgo de contraer enfermedades cardíacas (ILSI, 1995; Levine et al., 1999).

Diferentes procesos oxidativos están involucrados en la generación de cataratas. La oxidación de proteínas es generada por la exposición a la luz. Estudios epidemiológicos han demostrado una relación inversa entre el consumo de antioxidantes como vitamina C, E y carotenoides y la aparición de cataratas.

Estudios bioquímicos relacionan la aparición de desordenes en el cerebro y en el sistema nervioso central como consecuencia de la acción de oxidantes. El estrés oxidativo estaría vinculado en la iniciación como en el desarrollo de la enfermedad de Parkinson (Zhou et al., 2008). Pruebas pilotos demuestran una regresión en la aparición de la enfermedad de Parkinson con la ingesta de vitamina C y E (ILSI, 1995).

ILSI recomienda la ingesta de una dieta con un adecuado aporte de antioxidantes nutritivos para prevenir la acción de los radicales libres. En nuestra dieta, la ingesta de frutas y vegetales son la principal fuente de los antioxidantes nutritivos pero una fuente alternativa puede consistir en un alimento fortificado (ILSI, 1995).

2.2 Vitamina C

Con el término genérico de vitaminas se identifican al conjunto de sustancias orgánicas presentes en alimentos naturales que son esenciales, en cantidades mínimas, para el metabolismo y la regeneración celular, cuya falta causa enfermedades carenciales. Cada vitamina realiza una función específica, en consecuencia, no puede ser reemplazada. Principalmente actúan como coenzimas y como precursores de las coenzimas en la regulación de los procesos metabólicos y regeneración celular.

La vitamina C funciona fisiológicamente como antioxidante debido a su elevado poder reductor, contrarrestando los efectos nocivos de las especies reactivas del oxígeno (Buettner, 1993; Schlueter et al., 2010); su poder reductor está asociado a su capacidad de ceder electrones oxidándose y de esta manera evita la oxidación de otros componentes. Como vitamina, es un cofactor para las enzimas involucradas en la

biosíntesis de colágeno, carnitina, hormonas y neurotransmisores (Schlueter et al., 2010). El ácido ascórbico (AA) y el ácido dehidroascórbico (DHAA) son conocidos como vitamina C debido a que ambos ejercen actividad antiescorbuto, sin embargo el AA es la forma funcional y primaria en organismos vivos (*Institute of Medicine IOM*, 2000).

2.2.1 Reseña histórica

La enfermedad ocasionada por la deficiencia nutricional de la vitamina C, escorbuto; ha sido bien documentada a través de la historia presente generalmente en navegantes. Esta enfermedad era conocida en época de las antiguas civilizaciones egipcia, griega y romana, en el año 450 A.C., Hipócrates describía por primera vez los síntomas de la misma. En el año 1747, James Lind investigando la manera de curarla incluyó en la dieta diaria de un grupo de pacientes dos naranjas y un limón por el término de 6 días. Los pacientes mejoraron radicalmente y su experiencia se publicó en 1753 (Schlueter et al., 2010). Alrededor del 1800, se reconocía al escorbuto como una deficiencia nutricional y que la ingesta de frutas y vegetales frescos era la manera recomendada para la cura. La relación entre el escorbuto y algún tipo de sustancia presente en los vegetales fue descubierta en 1918 cuando Harden & Silva aislaron del jugo de limón una sustancia que prevenía la enfermedad. En 1928 Szent-Györgyi mientras estudiaban las reacciones de oxidación y reducción de plantas y animales, aíslan un poderoso agente reductor al que denominaron ácido hexurónico.

En 1932 Svirebely & Szent-Györgyi y en forma independiente Waugh & King, reconocen al ácido hexurónico como perteneciente al mundo de las vitaminas y lo identificaron con el nombre de vitamina C.

En 1933 Birch et al. confirman con resultados contundentes a la vitamina C como el único y verdadero factor antiescorbuto. Ese mismo año Haworth con Hirst y en forma paralela Reichstein lograron la síntesis. Posteriormente en varios laboratorios, incluyendo el de Haworth, se

estableció su estructura molecular y se le asignó el nombre corriente de ácido ascórbico.

En el año 1934 se comenzó la producción industrial en Suiza (Berry Ottaway, 1993) y en el año 1937 Haworth & Szent-Györgyi recibieron el premio Nobel por sus investigaciones sobre la vitamina C (Oro y Donnamaría, 2006).

2.2.2 Producción industrial

La vitamina C ha sido producida comercialmente por extracción de plantas, síntesis química, fermentación y mediante procesos combinados de síntesis química y procesos fermentativos.

Según Ullmann's *Encyclopedia of Industrial Chemistry*, en la actualidad la producción se lleva a cabo por medio del proceso Reichstein ó por el nuevo proceso de fermentación de dos etapas. Ambas metodologías utilizan como principal materia prima el sorbitol, un producto derivado de la glucosa.

El método Reichstein tradicional es un proceso combinado de fermentación y síntesis química que conduce a la formación del ácido di-acetona-di-cetogulónico (conocido como DAKS por *di-acetone-ketogulonic acid*) que posteriormente es disuelto en una mezcla de solventes orgánicos y convertido a vitamina C mediante una catálisis ácida. La purificación es realizada mediante recristalización.

El nuevo proceso de fermentación de dos etapas fue desarrollado en China. Comparado con el método tradicional, esta nueva metodología reemplaza las reacciones químicas que conducen a la formación de DAKS por una segunda fermentación. El producto intermedio que se obtiene es conocido como ácido diceto-L-gulónico. Las etapas finales del proceso son similares al proceso tradicional. Las ventajas del proceso de doble fermentación residen en menores costos fijos y de capital.

2.2.3 Estructura y propiedades

La fórmula empírica del ácido L-ascórbico es $C_6H_8O_6$ con masa molecular 176,13 uma, su fórmula estructural se muestra en la figura N° 5.

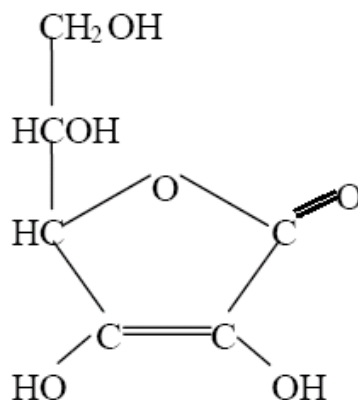


Figura N° 5. Estructura molecular del ácido L-ascórbico.

Químicamente el ácido ascórbico: 2,3-enediol-L-ácido glucónico-γ-lactona, es una lactona; compuestos orgánicos en que el grupo funcional procede de las funciones enediol conjugado y carbonilo. El grupo enediol se caracteriza por contener dos carbonos unidos en doble enlace teniendo cada uno grupos hidroxilos (C2 y C3) siendo el responsable de suministrar a la molécula sus propiedades reductoras y su carácter ácido. Sus propiedades ácidas están asociadas principalmente a la ionización del grupo hidroxilo en el carbono C3 debido a que la ionización del hidroxilo en el C2 es mucho menos favorable (Fennema, 2010).

La molécula posee dos carbonos asimétricos (C4 y C5) y por lo tanto son factibles dos pares de enantiómeros. La acción contra el escorbuto reside casi por completo en el isómero L (ácido L-ascórbico). El ácido L-isoascórbico (isómero óptico en la posición C5) y el ácido D-ascórbico (isómero óptico en la posición C4), no poseen la propiedad antiescorbuto pero muestran un potencial óxido-reducción similar al del isómero L.

El AA es un compuesto muy polar por lo tanto fácilmente soluble en agua (30 g en 100 ml) y algo soluble en alcohol etílico (2 g en 100 ml), ambos a 20 °C (Berry Ottaway, 1993). Es un ácido relativamente fuerte $pK_{a1} = 4,04$ (más fuerte que el acético con $pK_a = 4,76$). Al ceder hidrógeno se oxida de modo reversible en el organismo hacia ácido L-dehidroascórbico, pero si llega a ser hidrolizado se convierte en el ácido 2,3-dicetogulónico perdiendo irreversiblemente su propiedad antiescorbuto (IOM, 2000), ver figura N° 6. En el cuerpo humano, la regeneración del ácido dehidroascórbico a ácido ascórbico se logra mediante la acción sistemas enzimáticos (Schlueter et al., 2010).

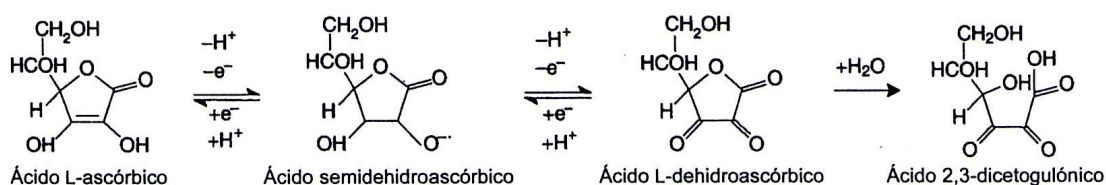


Figura N° 6. Oxidación del ácido L-ascórbico (Fennema, 2010).

2.2.4 Fuentes

Muchos mamíferos tienen la capacidad de sintetizar la vitamina C, no así el hombre; para éste es un nutriente esencial debido a la carencia de la enzima l-gulonolactona-oxidasa de la cadena biosintética que conduce a la formación de ácido ascórbico a partir de glucosa (IOM, 2000). Por este motivo y por la incapacidad de almacenar este compuesto en el cuerpo por su naturaleza hidrosoluble, dependemos de fuentes externas para suplir las necesidades nutricionales.

La vitamina C es ingerida en su forma reducida u oxidada a través del intestino delgado del humano. El AA es absorbido mediante transporte activo y el ácido dehidroascórbico con menor frecuencia es incorporado mediante difusión facilitada (Schlueter et al., 2010).

El Código Alimentario Argentino (CAA) en la Resolución MERCOSUR/GMC/RES. N° 46/03, REGLAMENTO TÉCNICO MERCOSUR

SOBRE EL ROTULADO NUTRICIONAL DE ALIMENTOS ENVASADOS, anexo A, indica los valores de Ingesta Diaria Recomendada de nutrientes (IDR); siendo para la vitamina C de 45 mg. Este valor está alineado a las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*, FAO) (CAA, MERCOSUR/GMC/RES. N° 46/03).

En Estados Unidos, la *Food and Drug Administration* (FDA 21CFR104) y en la Comunidad Europea (Comunidad Europea, Directiva 90/496/CEE) establecen una ingesta diaria de 60 mg (FDA 21CFR104). El *Institute of Medicine*, sin embargo recomienda una ingesta diaria de 90 mg/día (IOM, 2000).

Aunque la ingesta diaria recomendada varía entre 45 a 90 mg/día y esta dosis evitaría una deficiencia, muchos expertos recomiendan incrementar estos valores para un óptimo funcionamiento de la vitamina en el organismo desde 60 mg/día hasta 200 mg/día (Levine et al., 1999). Se presentan pocas contraindicaciones en la ingesta de AA, generalmente diarrea, por lo tanto el *Institute of Medicine* ha establecido un límite de 2000 mg/día (IOM, 2000).

La principal fuente de vitamina C son los alimentos, las frutas cítricas como naranja, frutilla, limón y algunos vegetales como brócoli, pimientos y tomates entre otros, ver tabla N° II. El pescado y la leche son también fuentes de este nutriente pero en menor proporción. En la actualidad también es factible adquirir la vitamina C a través de otra categoría de alimentos denominados fortificados, en donde la proporción de vitamina es superior al contenido natural medio del alimento al haber sido suplementado significativamente. Los suplementos farmacéuticos también suministran la vitamina pero no están incluidos en la categoría de alimentos.

Tabla N° II: Contenido de vitamina C en alimentos (DSM, 2007 y Berry Ottaway, 1993).

ALIMENTO	VITAMINA C (mg/100g)
Acerolas (fruto del <i>Crataegus azaroluz L.</i>)	1,600
Grosella negra (<i>Blackcurrants</i>)	200
Pimientos	138
Brócoli	115
Hinojo	95
Kiwis	71
Frutillas	64
Naranjas	30 - 65
Limón	30 -55
Uvas	37-50
Ananá	25
Tomates	10-40

2.2.5 Vitamina C y prevención de enfermedades

La vitamina C cumple un rol muy importante en el mantenimiento de la salud teniendo implicancias sobre diferentes aspectos, entre los cuales se pueden mencionar:

- Es esencial para el buen funcionamiento del sistema inmunológico por su participación en la actividad de linfocitos, neutrófilos, fagocitos, anticuerpos y en la producción de interferón (Oro y Donnamaria, 2006). Ayuda a la generación de inmunoglobulina en pos de controlar reacciones inflamatorias. Actualmente se reconoce además participación en la prevención de cuadros gripales, reduciendo la severidad y

duración de las mismas debido a la baja formación de histamina (Schlueter et al., 2010).

- Favorece la absorción y biodisponibilidad de hierro en el intestino en su estado ferroso (Schlueter et al., 2010) e inhibe la formación de nitrosaminas (Oro y Donnamaría, 2006).
- Como antioxidante la vitamina C trabaja conjuntamente con la vitamina E, coenzima Q y el betacaroteno (pro-vitamina A) protegiendo al organismo de los radicales libres (Oro y Donnamaría, 2006). A diferencia de los últimos tres antioxidantes que cumplen funciones en las membranas celulares lipídicas, la vitamina C lo hace principalmente en los fluidos corporales debido a su solubilidad en agua. Sin embargo también participa como antioxidante en medios lipídicos regenerando la vitamina E (Schlueter et al., 2010; DSM, 2007). Al neutralizar los radicales libres se cree que contribuyen en disminuir el proceso de envejecimiento y degeneración de las células.
- Participa en el metabolismo de grasas (Oro y Donnamaría, 2006), por lo que se considera un factor importante para mantener los niveles adecuados de lipoproteínas de baja densidad (*Low Density Lipoproteins*, LDL) y de lipoproteínas de alta densidad (*High Density Lipoproteins*, HDL), conocidos como colesterol malo y colesterol bueno respectivamente.
- Juega un papel fundamental como coenzima en la síntesis de colágeno (Oro y Donnamaría, 2006), proteína que es el principal constituyente de los tendones y que también se encuentra presente en la piel, huesos, dientes, ligamentos, cartílagos y vasos sanguíneos. Se cree que las manifestaciones clínicas del escorbuto están fundamentadas en la síntesis de colágeno defectuoso y de mala calidad debido a la carencia de vitamina C.
- Es indispensable para el buen funcionamiento de las hormonas producidas por las glándulas suprarrenales (Oro y Donnamaría, 2006).
- Participa en los mecanismos de coagulación y en consecuencia en la cicatrización de las heridas (Oro y Donnamaría, 2006).

- Es esencial en la biosíntesis de neurotransmisores en el sistema nervioso y de carnitina en los músculos (Oro y Donnamaría, 2006).
- El alto consumo de vitamina C ha sido asociado con una reducción en el riesgo de contraer algunos tipos de cánceres, en especial el cáncer de faringe, esófago, pulmón y estómago. A pesar que el mecanismo protector del AA no ha sido bien definido, se estima que está relacionado con sus propiedades antioxidantes (Schlueter et al., 2010).
- Estudios revelan una disminución en el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares asociadas a la ingesta de vitamina C (Schlueter et al., 2010).

2.2.6 Estabilidad del AA en sistemas alimenticios

El AA en estado puro y cristalino es relativamente estable, sin embargo esta característica no se cumple cuando está presente en productos alimenticios debido a que se evidencia una degradación.

Numerosas investigaciones se han realizado con el objetivo de determinar la cinética química y la influencia de diferentes factores en la degradación de la vitamina C. Entre los trabajos de investigación se pueden mencionar los estudios efectuados en jugos cítricos (Saguy et al., 1979; Alvarado y Viteri, 1989; Johnson et al., 1995); en soluciones acuosas (Blaug y Hajratwala, 1972); en yerba mate fortificada (Dresch et al., 2004); en rosa mosqueta (Pirone et al., 2002) y en néctar de Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) (Vieira et al., 2000) sin embargo no se cuenta con antecedentes en una golosina fortificada.

A raíz de los trabajos de investigación anteriormente mencionados se conoce que el mecanismo de degradación de la vitamina C es específico de cada alimento y puede llevarse a cabo en condiciones aeróbicas o anaeróbicas. Ambas pueden ocurrir simultáneamente en un mismo sistema sin embargo la vía oxidativa tiende a predominar (Tannenbaum, 1976). De acuerdo a Fennema (2010), las constantes de velocidad para la degradación anaeróbica del AA serán de dos o tres órdenes de magnitud inferior que las de la reacción oxidativa.

La degradación aeróbica conduce a la formación de un intermediario ácido dehidroascórbico (DHAA) que posteriormente es hidrolizado irreversiblemente a ácido dicetogulónico (DKGA) (IOM, 2000; Tannenbaum, 1976; Baiano et al., 2004). Ver figura N° 7. El ácido dicetogulónico posteriormente se oxida, deshidrata y polimeriza formando una serie amplia de otros productos nutritivamente inactivos (Fennema, 2010).

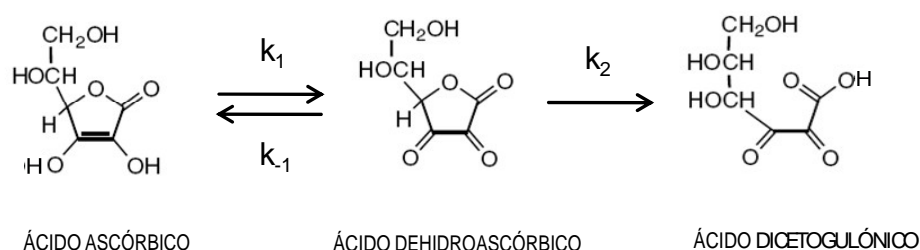


Figura N° 7. Degradación aeróbica del ácido ascórbico

A diferencia de la vía oxidativa, no se comprende en su totalidad el mecanismo involucrado en la degradación anaeróbica del AA en alimentos. Se estima que está implicada la rotura del puente lactona sin previa oxidación a DHAA quizás siguiendo el modelo de una tauterización enol-ceto (Fennema, 2010). Reacciones químicas adicionales y posteriores al DKGA contribuyen a la formación de pigmentos marrones como se muestra en la figura N° 8.

Independientemente del mecanismo de degradación, la apertura del anillo de lactona anula, de forma irreversible, la actividad de la vitamina C. Los productos implicados en las fases terminales de la degradación adquieren relevancia debido a su contribución de compuestos aromáticos o sápidos, como así también por su participación en el pardeamiento no enzimático (Fennema, 2010).

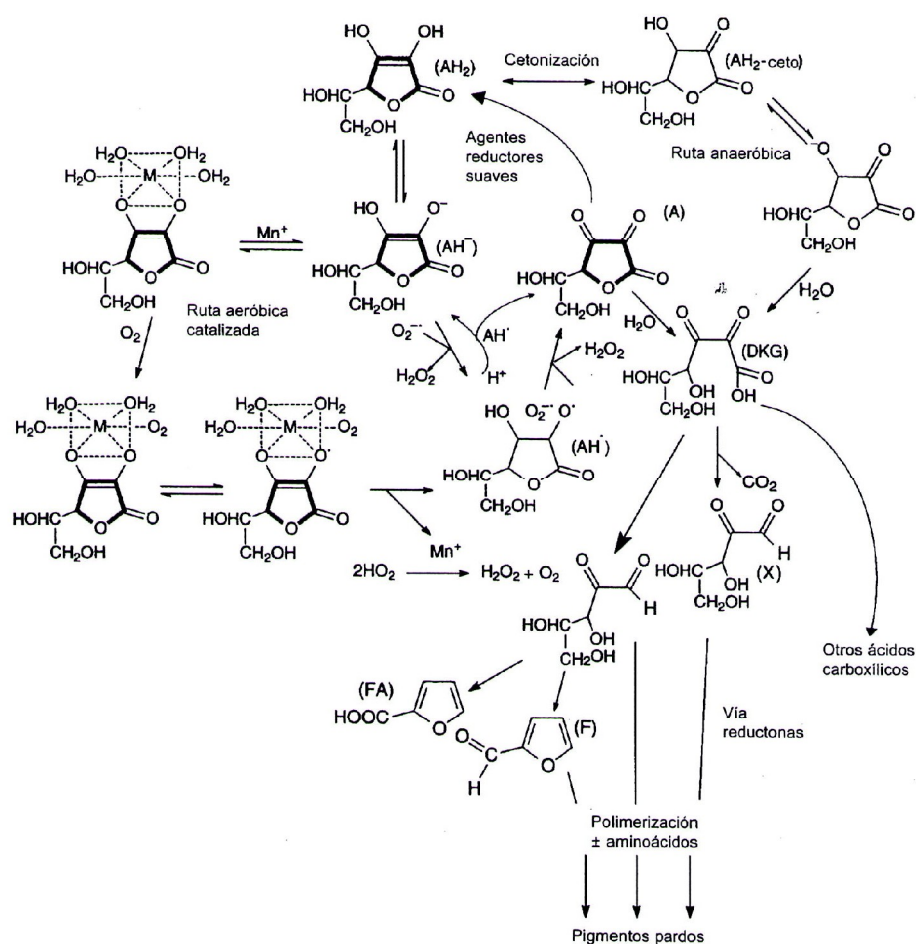


Figura N° 8. Esquema general de los mecanismos de las degradaciones oxidativas y anaeróbicas del AA. Abreviaturas: AH₂ ácido ascórbico, AH⁻ monoanión ascorbato, AH[•] radical semidehidroascorbato, A ácido dehidroascorbico, FA ácido 2-furoico, F 2-furaldehído, DKG ácido dicetogulónico, DP 3-desoxipentosa, X xilosa, Mn⁺ catalizador metálico, HO₂[•] radical perhidroxilo (Fennema, 2010).

La cinética evidenciada en la degradación oxidativa del ácido ascórbico se ajusta a un modelo de primer orden (Saguy et al., 1979; Robertson y Samaniego, 1986), a excepción del estudio realizado sobre el néctar de Cupuaçu donde los autores recomiendan una cinética reversible de primer orden con una estabilización de la concentración del ácido ascórbico en un valor equivalente a 0,4 del valor inicial para un rango de temperaturas entre 60 – 90 °C y con un pH= 3,2. Este comportamiento se ajusta al modelo reversible propuesto por Tannenbaum. En la Figura N° 9

se grafica la degradación de AA presente en el néctar de Cupuaçu en función del tiempo, representando por (X), y el aumento en la concentración de DHAA (O) asociado.

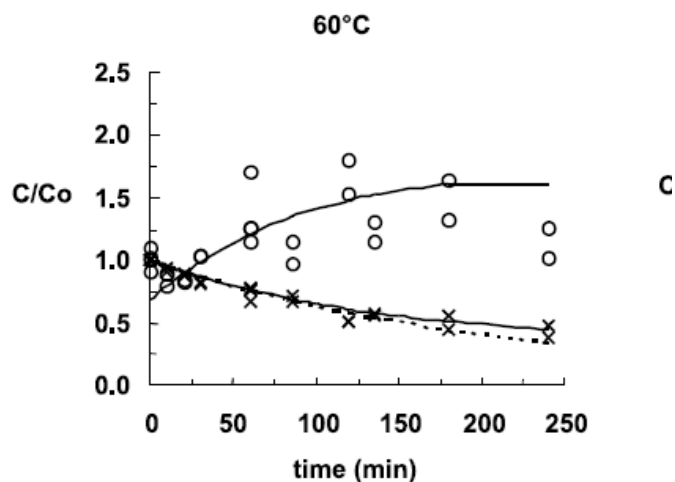


Figura N° 9. Degradación de AA (X) en función de la temperatura y tiempo en néctar Cupuaçu. Además se observa la variación de la concentración de DHAA (O) (Vieira et al., 2000).

A continuación se presenta la ecuación de cinética de primer orden reversible para el AA:

$$\frac{C_{AA} - C_{AA\infty}}{C_{AA0} - C_{AA\infty}} = e^{-k_1 t}$$

Donde:

C_{AA} : concentración relativa de AA al tiempo t

C_{AA0} : concentración relativa de AA inicial tiempo: 0 ($t_0 \sim 1$)

$C_{AA\infty}$: concentración relativa de AA en equilibrio

k_1 : constante de reacción

Es importante aclarar que los autores que realizaron el estudio sobre el néctar de Cupuaçu, reconocen una cinética de primer orden solo en la evaluación de cortos períodos de tiempo. La desviación de la cinética de

primer orden a un modelo reversible de primer orden es dependiente de la temperatura presentándose en 60 min a 60 °C y a 30 min a 99 °C. Se estima que debido a los calentamientos prolongados, la oxidación del AA se vuelve prácticamente imperceptible como consecuencia del agotamiento del oxígeno del medio alcanzando un nivel de equilibrio. Por lo tanto, el AA se comporta como un reactivo limitante impidiendo que la reacción continúe. A continuación se transcribe la ecuación de cinética de primer orden:

$$\frac{C_{AA}}{C_{AA0}} = e^{-k_1 t}$$

Donde:

C_{AA} : concentración relativa de AA al tiempo t

C_{AA0} : concentración relativa de AA tiempo inicial

k_1 : constante de reacción

El DHAA formado en alimentos durante la degradación del AA en la vía oxidativa es una reacción predominantemente irreversible; por lo que no puede ser reducido nuevamente a AA (Vieira et al., 2000). El ácido dicetogulónico (DKGA) es el siguiente producto formado como resultado de la hidrólisis del puente lactona. La hidrólisis es favorecida en condiciones alcalinas y decrece a medida que aumenta el pH, debido a que el DHAA es más estable a un pH en el intervalo de 2,5-5,5 (Fennema, 2010). Una cinética de primer orden representa la conversión de DHAA a DKGA con una velocidad proporcional a k_2 , de un pequeño valor comparado con k_1 (reacción reversible de AA a DHAA), por lo tanto esta última tiende a predominar y la conversión de DHAA a DKGA es solamente factible cuando el AA alcanza la concentración de equilibrio, ver figura N° 7.

A continuación se observan los valores obtenidos por Vieira en el néctar Cupuaçu, ver tabla N° III.

Tabla N° III. Parámetros cinéticos de la degradación del AA en el néctar Cupuaçu (18° Brix, pH 3,2) a 80°C

Modelo	k_1 (min ⁻¹)	$C_{AA\infty}$	R^2
Reversible de Primer Orden	0,0032 +/- 0,003	0,32	0,994
Primer Orden	0,0020 +/- 0,001	0	0,996

Laing et al. (1978) evaluaron la influencia de una alta temperatura (61-105°C) y una actividad acuosa ($a_w=0,69 - 0,90$) de sistemas modelos de alimentos. Los autores evidenciaron una cinética de orden cero debido a las altas temperaturas empleadas en el estudio, a diferencia de la cinética de primer orden de los estudios presentados por Waletzko y Labuza (1976) y por Nagy y Smoot (1977) debido a que estas investigaciones fueron realizadas a menores temperaturas.

De las investigaciones realizadas se puede concluir que la cinética presente en la degradación del ácido ascórbico es al menos dependiente de los siguientes factores:

- Alimento: la degradación depende de la composición del alimento, por lo tanto la velocidad de degradación del AA calculada en un determinado alimento no puede necesariamente utilizarse para predecir la cinética de degradación del AA en otra matriz alimentaria (Fennema, 2010).
- Condiciones de almacenamiento: en productos envasados la tasa de degradación del AA aumenta con un aumento en la temperatura de almacenamiento empleada entre -5 y 20 °C de acuerdo a la ecuación de Arrhenius (Fennema, 2010). Se ha observado además una modificación en el mecanismo de degradación de aeróbico a anaeróbico

según la temperatura empleada (Laing et al. 1978; Baiano et al. 2004) y de acuerdo a Vieira et al. (2000), este parámetro es determinante del orden de la cinética de degradación.

De acuerdo al estudio realizado por Baiano et al. (2004) en un sistema modelo de jugo cítrico envasado en diferentes materiales de empaque, presentaron un comportamiento dependiendo de la temperatura de almacenamiento; a 5°C la concentración de AA decrece durante el almacenamiento hasta que alcanza un valor constante, sin embargo a 35°C se observa una degradación continua. Este comportamiento está asociado a que a 5°C la permeabilidad del oxígeno al envase es despreciable debido a que la oxidación está relacionada al oxígeno disuelto en el medio, en cambio a 35°C el ingreso permanente de oxígeno a través del envase es el responsable de la degradación durante el almacenamiento.

- pH: la degradación oxidativa de la vitamina es una función no lineal del pH, debido a que las diversas formas iónicas del AA difieren en su sensibilidad a la oxidación (Fennema, 2010). La oxidación a DHAA ocurre más fácilmente a pH próximos al pK_{a1} : 4,04 a 25°C (Blaug and Hajratwala, 1972).
- Actividad de agua (a_w): la tasa de degradación se incrementa con aumentos en los valores de a_w entre 0,69-0,90 a temperaturas inferiores a 92 °C (Laing et al., 1978). Un aumento en la a_w está relacionado con un incremento en la disponibilidad de oxígeno. El agua funciona como solvente para hidratar y movilizar los reactivos (AA y oxígeno) (Richardson y Finley, 1985).
- Presencia de iones metálicos: el AA es muy sensible a la oxidación, especialmente cuando la reacción está catalizada por iones metálicos, como Cu^{+2} y Fe^{+3} (Fennema, 2010). Baiano et al. (2004) evidenciaron una incidencia negativa en la estabilidad de la vitamina C en envases de vidrio con nula permeabilidad al oxígeno, debido a la presencia de pro oxidantes, por ejemplo iones metálicos y los nitratos de sodio o potasio utilizados en la elaboración del vidrio. El ión cúprico es considerado el

catalizador más potente en la oxidación del AA (Richardson y Finley, 1985).

- Oxígeno: los resultados realizados por Baiano et al. (2004), respaldan la incidencia del tipo de material utilizado para el almacenamiento de un jugo cítrico y la degradación de AA. La mejor retención de vitamina fue evidenciada en envases de baja permeabilidad al oxígeno formulados con PET y compuestos secuestrantes para el mencionado gas. La degradación del contenido de AA es inicialmente afectada por el espacio libre del envase y por el oxígeno disuelto en el producto, pero pérdidas posteriores pueden ser controladas con las propiedades de barrera del envase (Brien O. y Robertson D., 1993)
- Fuentes lumínicas: la luz UV, en el rango de los 200 hasta 400 nanómetros, generalmente es la responsable de la degradación de los alimentos mediante la activación de reacciones de oxidación vía radicales libres. Conrad et al. 2002, evidenciaron la degradación del AA presente en jugos de manzana y naranja envasados en botellas de poliéster transparentes almacenados en la oscuridad, bajo la influencia de una luz fluorescente intensa y de una luz UV. La mayor degradación fue evidenciada en las muestras expuestas a una intensa luz UV. Una investigación posterior realizada por el mismo autor en el año 2005, evidenció una cinética de orden cero para la degradación de jugos de naranja y manzana envasados en botellas de poliester formulados con polietileno tereftalato (PET) y polietileno tereftalato con bajas dosis de polietileno naftalato (PEN) almacenados a 22 °C bajo la influencia de las mismas fuentes lumínicas. Además se pudo corroborar que los envases formulados con PEN, bajo condiciones de luz UV, brindan una protección adicional debido a su menor transmisión de luz UV (PEN filtra longitudes de onda de hasta 375 nm comparados con 320 nm del PET regular sin el aditivo) y no se encontraron diferencias significativas en las muestras mantenidas en oscuridad y bajo condiciones de luz fluorescente. Siempre que sea factible, la utilización de un envase opaco es la mejor alternativa para proteger a un alimento.

2.3 Alimentos fortificados

Los alimentos fortificados, conocidos como alimentos funcionales por la comunidad internacional, surgieron en Japón en la década de los años ochenta del siglo pasado. Cuando las autoridades del gobierno japonés comprendieron que para controlar los gastos generados por la mayor esperanza de vida, debían garantizar una mejor calidad de vida a base de alimentos que promuevan la salud y disminuyan el riesgo de enfermedades crónicas relacionadas con la alimentación. Como resultado de los proyectos de investigación realizados a gran escala; en el año 1991 se estableció una categoría de alimentos potencialmente beneficiosos denominados "alimentos de uso específico para la salud" (*Foods for Specific Health Use*, FOSHU). Estos son alimentos en los que se espera que ejerzan un efecto beneficioso específico sobre la salud, por adición de determinados constituyentes activos o por un efecto derivado de la supresión en los mismos de alérgenos alimentarios. (ILSI, 2004)

En Europa, el ILSI en el año 1999, publica un documento de consenso: "Conceptos Científicos sobre los alimentos funcionales en Europa" donde se establece una definición de alimentos funcionales y se elabora por vez primera un marco global que incluyó una estrategia para la identificación y desarrollo de los alimentos funcionales y para la fundamentación científica de sus efectos, a fin de justificar las declaraciones de propiedades nutricionales comúnmente denominados *claims* que se realizan sobre los mismos. "...un alimento puede considerarse funcional si se demuestra satisfactoriamente que ejerce un efecto beneficioso sobre una o más funciones selectivas del organismo, además de sus efectos nutritivos intrínsecos, de modo tal que resulte apropiado para mejorar el estado de salud y bienestar, reducir el riesgo de enfermedad, o ambas cosas. Los alimentos funcionales deben seguir siendo alimentos, y deben demostrar sus efectos en las cantidades en que normalmente se consumen en la dieta. No se trata de comprimidos ni cápsulas, sino de alimentos que forman parte de un régimen normal..." (ILSI, 2004).

Un alimento funcional podría no ser necesariamente beneficioso para todos los integrantes de la población. Según el ILSI, desde un punto de vista práctico, un alimento funcional puede ser:

- Un alimento natural en el que uno de sus componentes ha sido mejorado mediante condiciones especiales de cultivo.
- Un alimento al que se le ha añadido un componente para que produzca beneficios (por ejemplo, bacterias probióticas seleccionadas, de probados efectos beneficiosos sobre la salud intestinal).
- Un alimento del cual se ha eliminado un componente para que produzca menos efectos adversos sobre la salud (por ejemplo, la disminución de ácidos grasos saturados).
- Un alimento en el que la naturaleza de uno o más de sus componentes ha sido modificada químicamente para mejorar la salud (por ejemplo, los hidrolizados proteicos adicionados en los preparados para lactantes para reducir el riesgo de alergenicidad).
- Un alimento en el que la biodisponibilidad de uno o más de sus componentes ha sido aumentada para mejorar la asimilación de un componente beneficioso.
- Cualquier combinación de las posibilidades anteriores.

En nuestro país, el Código Alimentario Argentino (CAA) en el capítulo XVII artículo 1363 - (Resolución Conjunta SPyRS y SAGPyA N° 118/2008 y N° 474/2008), define alimentos fortificados:

“Se entiende por Alimentos Fortificados aquellos alimentos en los cuales la proporción de proteínas y/o aminoácidos y/o vitaminas y/o sustancias minerales y/o ácidos grasos esenciales es superior a la del contenido natural medio del alimento corriente, por haber sido suplementado significativamente.

La porción del alimento fortificado deberá aportar entre un:

- 1) 20 % y 50 % para vitaminas liposolubles y minerales
- 2) 20 % y 100 % para vitaminas hidrosolubles...” (CAA, 2008)

“...los nutrientes incorporados deberán:

a) Ser estables en el alimento en las condiciones habituales de almacenamiento, distribución, expendio y consumo y presentar una adecuada biodisponibilidad.

b) No presentar incompatibilidad con ninguno de los componentes del alimento ni con otro nutriente agregado.

c) Estar presente en niveles tales que no ocasionen una ingesta excesiva por efecto acumulativo a partir de otras fuentes de la dieta.

No se autorizará la fortificación de las siguientes clases de alimentos: cárneos y productos derivados, helados, alimentos azucarados -Capítulo X- (excepto los que contengan jugo en su composición), bebidas alcohólicas o polvos para prepararlas (excepto en ambos casos que contengan jugo en su composición), aguas, aguas carbonatadas, aguas minerales, con o sin gas..." (CAA, 2008).

Los alimentos fortificados se encuentran enmarcados dentro de la categoría de Alimentos de régimen o dietéticos, artículo 1339 - (Resolución Conjunta SPReI y SAGPyA N°94/08 y N° 357/08) como aquellos alimentos para satisfacer necesidades alimentarias específicas de determinados grupos de personas sanas.

2.3.1 Situación nutricional

Los profesionales de la salud coinciden en que la mejor manera de obtener los aportes recomendados de vitamina C es ingiriendo una dieta balanceada que contenga una variedad de alimentos frescos, preferentemente vegetales como frutas (principalmente cítricos) y verduras.

En nuestro país, de acuerdo a los datos obtenidos de las encuestas de consumos de alimentos realizados por el Centro de Estudios Sobre Nutrición Infantil (CESNI) en el año 2007 sobre un total de 1.434 niños entre 6 y 13 años, de las principales ciudades de Argentina, se concluye que 49% de los mismos no cubren las recomendaciones de ingesta diaria

de vitamina C principalmente debido al bajo consumo de frutas y vegetales.

El producto fortificado con vitamina C, está orientado a ser consumido por este grupo etario y por lo tanto podría ser un vehículo para reforzar la ingesta de este micronutriente. Para poder cumplir con las exigencias del CAA, la fortificación de la golosina se realizará sobre un producto formulado con jugo natural de fruta.

En cada nuevo alimento funcional que se genera surgen dificultades tecnológicas y comerciales, principalmente aquellas relacionadas a la aceptabilidad y estabilidad del alimento (Yazici et al., 1997; Kim et al., 2000). Para garantizar el contenido de vitamina C rotulado en un alimento fortificado con este nutriente, durante el almacenamiento y comercialización, es necesario conocer la cinética de degradación y los factores que influyen en la misma.

2.4 Envases

Desde la antigüedad, los alimentos han sido envasados con el objetivo de conservar sus cualidades, facilitar su transporte y comercialización. Mediante el envasado, se logra preservar el producto gracias al aislamiento que brinda el envase entre el producto y los factores ambientales perjudiciales para el mismo, agua, aire, luz, contaminantes, etc.

Hasta comienzos del siglo XX, el acero y el vidrio eran los materiales comúnmente empleados en la fabricación de los envases, denominados rígidos (frascos, latas, bidones, barriles). Sin embargo en la actualidad, contamos con un mayor número de alternativas de materiales asociadas al desarrollo de la industria de los materiales flexibles.

Al comparar las propiedades comunes presentes entre las dos familias de envases, observamos que los materiales flexibles ofrecen un mayor número de opciones de permeabilidad o "barrera" contra los gases, principalmente oxígeno y vapor de agua, asociados al tipo de monómero

utilizado en la fabricación del polímero. De esta manera es factible obtener un material de empaque que se ajuste a las necesidades de cada producto en particular.

2.4.1 Propiedades de barrera

La permeabilidad de los gases a través de una película plástica tiene analogías con los fenómenos de difusión (Cheftel et al., 1992), una transferencia de masa impulsada por un gradiente de concentración a ambos lados del film. Pueden adicionarse los fenómenos de adsorción sobre la membrana por afinidad química o solubilidad y el de desorción. La difusión se realiza a través de eventuales microporos, influenciada por el tamaño de las moléculas de gas y por las zonas amorfas (no cristalinas) presentes y está regida por la primera ley de Fick:

$$q = -D \frac{\delta C}{\delta x}$$

Donde:

q : es la cantidad de gas que pasa por unidad de tiempo y unidad de superficie

D : coeficiente de difusión

$\delta C / \delta x$: gradiente de concentración C del gas por unidad de espesor x de la membrana. El signo negativo indica que la difusión se hace en el sentido de concentraciones decrecientes, ver figura N° 10.

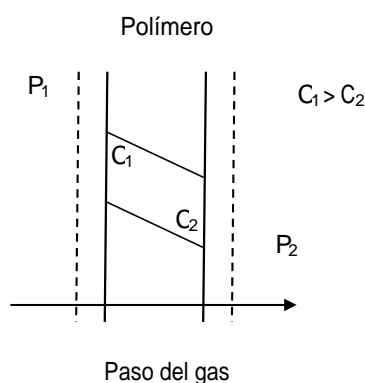


Figura N° 10. Difusión de un gas a través de una película plástica

La ecuación puede integrarse:

$$q = D (C_1 - C_2) / L$$

Donde: L: espesor de la membrana y C: concentración del gas en la membrana.

La misma ecuación puede expresarse a partir de la ley de Henry, que indica que la cantidad de gas disuelto en una solución es directamente proporcional a la presión parcial de ese gas en contacto con la solución:

$$\text{Ley de Henry: } C = S * p$$

$$q = D S (p_1 - p_2) / L$$

Donde:

S= coeficiente de solubilidad del gas en el polímero

p= presión parcial del gas en la superficie

$P = D * S$ es conocido como el coeficiente de permeabilidad de un material frente a un gas expresado en centímetros cúbicos a la presión atmosférica a 0 °C.

Los coeficientes D y P pueden medirse experimentalmente y S calcularse.

Los factores que ejercen una influencia en la permeabilidad están relacionados con la naturaleza del polímero, entre ellos:

- a) Estructura química: los diferentes grupos funcionales en la estructura química de un polímero influyen en la solubilidad del gas permeante. Para cada grupo funcional en un polímero existe una diferente permeabilidad (Miller y Krochta, 1997).

- b) Cristalinidad: la permeabilidad varía de manera inversa al grado de cristalinidad del polímero. Al aumentar la cristalinidad disminuye la difusión debido a que existe un camino más complejo que el gas debe atravesar, reduciendo el movimiento de las moléculas. La solubilidad se reduce porque hay menos porciones amorfas del polímero que participan en la disolución del gas permeante (Kumins, 1965; Miller y Krochta, 1997).
- c) Densidad: el tamaño de las cadenas poliméricas determina la densidad y la cristalinidad del mismo. Disminuyendo la densidad se incrementa la permeabilidad (Pascat, 1986).
- d) Orientación molecular: un mayor grado de orientación molecular, por ejemplo, en polímeros cristalinos, disminuye de manera considerable la permeabilidad. En los materiales amorfos no se observa disminución significativa a la permeabilidad (Pascat, 1986).
- e) Insaturaciones: la presencia de dobles enlaces incrementa de manera importante la permeabilidad de los polímeros (Pascat, 1986).
- f) Simetría y polaridad: De dos polímeros con energías de activación difusional comparables, aquel que tenga una estructura menos simétrica, tendrá una constante difusional (D°) más elevada para un gas a una temperatura determinada (Paine y Paine, 1983). La energía de activación del proceso difusional es una función de la cohesión del polímero (energía necesaria para separar los átomos y formar un poro). Para dos polímeros con la misma simetría se observa que mientras mayor sea la polaridad, mayor será la energía de cohesión (ED) y por lo tanto la difusión (D) será menor, al igual que la permeabilidad. Las fuerzas intermoleculares afectan el grado de libertad de los grupos en las cadenas poliméricas, siendo las estructuras con puentes de hidrógeno más fuertes que aquellas que poseen fuerzas de Van Der Waals (Pascat, 1986).
- g) Aditivos y plastificantes: en muchas ocasiones a los materiales plásticos les son añadidos otros monómeros y/o polímeros,

generalmente para incrementar la permeabilidad. La copolimerización puede disminuir las propiedades de barrera contra los gases permeantes si el copolímero posee mayor permeabilidad o genera un incremento en la elasticidad. Por otro lado, otros aditivos tienen otras funciones como la de retener agua en materiales hidrofílicos, este efecto genera plastificación del polímero, provocando un aumento en los poros por lo que el gas se difunde más rápido (Pascat, 1986). El uso de plastificantes para la elaboración de polímeros afecta la difusión de un gas disminuyendo el valor de ED e incrementando el de D^0 (Paine y Paine, 1983).

- h) Reticulación: es la formación de puntos inter y/o intramoleculares entre las cadenas de un polímero. Un aumento en la cantidad de estos puntos conduce a una disminución en el valor de la difusión. La permeabilidad no es afectada de manera importante por la reticulación. Sin embargo, existe una ligera correspondencia en la disminución de la permeabilidad respecto al aumento en el grado de reticulación, afectando la difusión del gas y no su solubilidad en el polímero (Pascat, 1986).
- i) Naturaleza del gas permeante: existen algunos parámetros importantes que afectan la permeabilidad de un gas a través de una red polimérica concernientes a su naturaleza. El tamaño, la forma y su polaridad, junto con su facilidad de condensación afectan de manera importante su permeabilidad (Kumins, 1965; Welty-Chanes et. al 2005; Pascat, 1986; Paine y Paine, 1983).
- j) Tamaño de la molécula: generalmente la difusión y la permeabilidad disminuyen si el diámetro de la molécula que se difunde a través del empaque aumenta.
- k) Forma de la molécula: las moléculas lineales presentan mayor difusión y permeabilidad. Una ligera variación de la forma lineal trae aparejado una reducción en los valores de permeabilidad (Pascat, 1986).

- l) Polaridad: las moléculas no polares se difunden a través de los materiales poliméricos no polares. Este fenómeno está directamente relacionado con la solubilidad de las moléculas en materiales que poseen polaridades similares (Pascat, 1986).
- m) Condensación y solubilidad: la solubilidad generalmente depende de su compatibilidad con el polímero. La diferencia de permeabilidad que existe entre moléculas como N₂, O₂, CO₂ y vapor de agua se debe a su facilidad de condensación a una temperatura dada. Los vapores más solubles son aquellos que se condensan más fácilmente. Las permeabilidades de los gases, por lo tanto, dependerán de su temperatura y presión de condensación. Otra constante física directamente relacionada con la solubilidad de los gases es su punto de ebullición. Mientras mayor sea el punto de ebullición, mayor será la permeabilidad del gas en cuestión (Pascat, 1986).
- n) Temperatura: La relación de la permeabilidad con la temperatura es bien conocida, en 1941 Barrer determinó que esta dependencia sigue el modelo de Arrhenius:

$$P = P^{\circ} e^{(-E_a/RT)}$$

En donde P° es un factor independiente de la temperatura, E_a es la energía de activación a la permeabilidad del gas, R es la constante de los gases y T es la temperatura absoluta (Talasila y Cameron, 1997).

La linearización de la ecuación resulta:

$$\ln P = -E_a/RT + \ln P^{\circ}$$

Donde E_a/R es la pendiente de la línea recta (Paine y Paine, 1983).

Se sabe que la difusión D y la solubilidad S también siguen el modelo de Arrhenius (Paine y Paine, 1983):

$$D = D^{\circ} e^{-E_D/RT}$$

$$S = S^{\circ} e^{-E_s/RT}$$

- o) Presión: para los gases ideales, existe una proporcionalidad entre la cantidad de gas que pasa por unidad de tiempo y unidad de superficie y la diferencia de presión entre las dos caras del polímero. Sin embargo, una vez alcanzado el equilibrio, la permeabilidad es independiente de la diferencia de presión (Pascat, 1986).
- p) Espesor: la velocidad de transferencia es inversamente proporcional al espesor de la película y es directamente proporcional al área de exposición (Pascat, 1986).

2.4.2 Materiales flexibles

En la actualidad, la industria de la golosina utiliza principalmente para la fabricación de sus envases bolsas de tres costuras bilaminados (figura N°11), en lugar de las monoláminas debido a las mejores propiedades que ofrecen. El bilaminado es producido mediante la tecnología de laminación, unión de dos polímeros mediante un adhesivo, y para lograr la combinación de las propiedades de los monómeros individuales, generalmente un monómero aporta propiedades mecánicas como rigidez y el otro es el responsable de las propiedades de barrera. Ver figura N° 12.

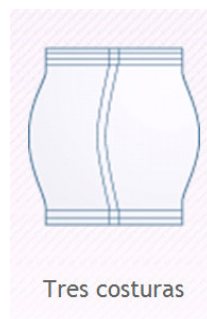


Figura N° 11. Bolsa de tres costuras



Figura N° 12. Estructura bilaminar

Es factible mejorar la barrera al oxígeno de un polímero mediante la aplicación de un recubrimiento, llamado comúnmente *coating*, de policloruro de vinilideno (PVDC) o etilvinilalcohol (EVOH), a diferencia del EVOH, el PVDC no presenta alteraciones en su propiedad de barrera al oxígeno por la humedad (Cheftel et al., 1992). El PVDC es un polímero de recubrimiento altamente eficaz utilizado como recubrimiento del PET y es producido mediante la polimerización de un monómero de cloruro de vinilideno con otros monómeros tales como los ésteres acrílicos y los grupos carboxilos no saturados, ver figura N° 13. Se diferencia del Policloruro de vinilo (PVC), al contener dos átomos de cloro en su monómero. La simetría y la densidad de las moléculas de PVDC le confieren al material sus excelentes propiedades de barrera contra la grasa, los gases (O_2 , CO_2 , N_2), el agua, propiedades ópticas y de resistencia química; sin embargo es un material rígido y frágil debido a su elevada cristalinidad.

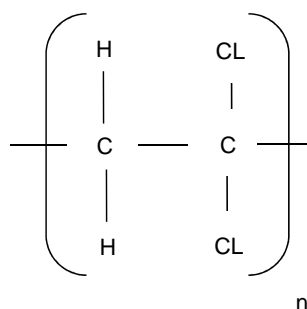


Figura N° 13. Estructura del monómero del policloruro de vinilideno (PVDC)

Entre los principales polímeros utilizados para la fabricación de películas se pueden mencionar:

a) Polietileno de baja densidad

El polietileno de baja densidad, PE, es un sólido ceroso, 50 a 60% cristalino, con un punto de fusión aproximado de 115 °C y una densidad entre 0,91 y 0,94 g/cm³. Mecánicamente es débil pero flexible, resistente y se procesa con facilidad. La lámina construida con este material tiene una transparencia aceptable en muchas aplicaciones de empaques, provee una barrera al vapor de agua no así al oxígeno. No tiene olor o sabor que pueda afectar al producto empacado y es fácilmente termosellable. Debido a esta última propiedad, generalmente el polietileno de baja densidad es el responsable del sellado en los envases de tres costuras. Ver figura N° 14 donde se explicita la estructura del polímero.

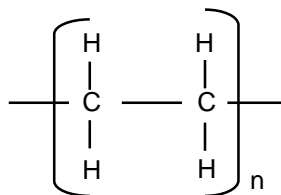


Figura N° 14. Estructura molecular del monómero del polietileno de baja densidad

b) Polipropileno (PP)

Es el plástico de menor densidad utilizado en aplicaciones de envasado (densidad 0,905 g/cm³). Su fuerza tensil, dureza y rigidez son mayores que las de los polietilenos. Biorientado, es mucho más transparente que el PEBD. La capacidad de barrera al oxígeno del PP es muy baja, sin embargo este material tiene buenas propiedades de barrera contra la humedad a temperatura ambiente, esto no se cumple a elevadas temperaturas (Proffit, 1994). Resiste temperaturas hasta 140 °C. Ver figura N° 15.

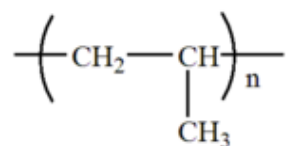


Figura N° 15. Estructura molecular del monómero del polipropileno

c) Tereftalato de Polietileno/Polietilen-tereftalato (PET)

El PET es el poliéster más difundido dentro de los materiales de envase, como su nombre lo indica es un éster formado por el etilenglicol y el ácido tereftálico. Posee buena resistencia química a las grasas y aceites, buenas propiedades ópticas y resistencia mecánica (rigidez). Muy buena barrera a CO₂ y una moderada barrera a O₂ y humedad. No es un material termosellable, requiere la laminación con otro polímero que le brinde esta característica. Tiene excepcionales características mecánicas y resistencia a altas temperaturas cuando se encuentra en estado cristalino. Ver figura N° 16.

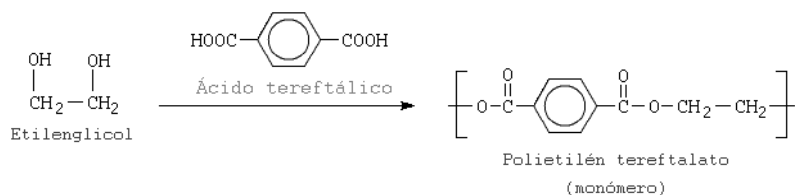


Figura N° 16. Estructura molecular del monómero del PET

d) Poliamidas

Es el nombre técnico del conocido nylon. Es una lámina clara, con muy buenas propiedades de barrera al oxígeno y a otros gases, pero muy pobre al vapor de agua. Es muy resistente, y tiene sobresalientes propiedades de resistencia a la perforación y al rasgado, aún a altas temperaturas. La poliamida se usa para proporcionar una barrera al oxígeno en estructuras multilaminares, aunque aporta propiedades de barrera más bajas en comparación

con el etilvinilalcohol (EVOH) y PVDC (Proffit, 1994). Ver figura N° 17.

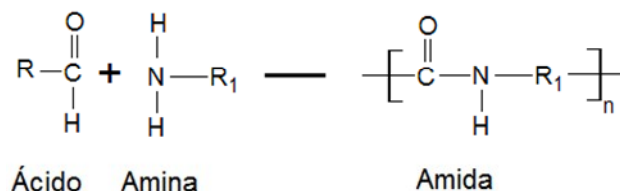


Figura N° 17. Estructura molecular del monómero de las poliamidas

A continuación se realiza un cuadro comparativo de las propiedades de barrera al oxígeno de los polímeros más empleados en la industria. Ver tabla N° IV.

Tabla N° IV. Clasificación de diversos polímeros según sus propiedades de barrera al oxígeno (adaptación de Cheftel et al., 1992).

BARRERA LIGERA	BARRERA MEDIA	BARRERA FUERTE
Polipropileno	PVC	Poliamida
Polietileno	PET	PET/PVDC
		PP/PVDC
		PET/EVOH
		PP/EVOH

La *American Society for Testing and Material* (ASTM) ha establecido las metodologías para la determinación de la permeabilidad al oxígeno y al vapor de agua en películas plásticas:

- ASTM D 3985 - 95: *Standard test method for Oxygen Gas Transmission Rate through plastic film and sheeting using a coulometric sensor.*
- ASTM F 1249 - 01: *Standard test method for Water Vapor Transmission Rate through plastic film and sheeting using a modulated infrared sensor.*

Además definió:

- *Oxygen transmission rate (OTR): the quantity of oxygen gas passing through a unit area of the parallel surfaces of a plastic film per unit time under the conditions of the test. A commonly used unit is cm^3/m^2 per day.*
- *Water vapor transmission rate (WVTR): the time rate of water vapor flow normal to the surfaces, under steady-state conditions, per unit area. An accepted unit of WVTR is g/m^2 per day.*

En la tabla N° V se indican los valores de referencia para los diferentes polímeros:

Tabla N° V. Permeabilidad al oxígeno y al vapor de agua de los principales polímeros. Fuente: Exxon Mobil Chemical Company.

FILM	OTR 23 °C, 0% HR cm^3/m^2 / 24 h	WVTR 38 °C, 98% HR g/m^2 / 24 hr
Valores de referencia para 25,4 mic de espesor		
EVOH* (ethylene vinyl alcohol)	0,08 - 1,9	22 - 124
Biax Nylon-6	18,6 - 39	155 - 202
O PET (oriented polyester)	31 - 93	16 - 20
Biax OPP (BOPP)	1.550 - 2.500	3,9 - 6,2
Cast PP	2.300 - 3.100	9,3 - 11
HDPE (high density polyethylene)	2.300 - 3.100	4,7 - 7,8
OPS (oriented polystyrene)	4.350 - 6.200	109 - 155
LDPE (low density polyethylene)	7.000 - 8.500	16 - 23
CON TRATAMIENTOS (coating o metalizados)		
Metallized OPET	0,16 - 1,7	-
Metallized Nylon - 6	0,78	-
PVDC - coated OPET	4,7 - 7,8	-
High Barrier PVDC-coated OPP	4,7 - 9,3	-
PVDC - coated biax Nylon-6	5,4 - 7,8	-
Metallized OPP	19 - 160	-
Sealable PVDC - coated OPP	23 - 54	-

* depende del contenido de etileno

A partir del análisis de las propiedades de barrera de los diferentes materiales, se puede contrarrestar los efectos adversos del oxígeno sobre la vitamina C. Es factible utilizar diferentes materiales de empaque para controlar la permeabilidad del envase al oxígeno.

CAPÍTULO N° 3: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

El cuerpo humano es incapaz de sintetizar el AA por lo tanto es un nutriente esencial en su dieta; esto se debe a la carencia de la enzima L-gulonolactona oxidasa en la cadena biosintética que conduce a la formación de ácido ascórbico a partir de glucosa (Chatterjee, 1978). Por tal motivo, como fuente de esta vitamina el hombre depende de su dieta o suplementos nutricionales.

El Código Alimentario Argentino (CAA) recomienda una ingesta diaria de 45 mg de vitamina C, en Estados Unidos la *Food and Drug Administration* (FDA) establece una ingesta diaria de 60 mg y 100 mg para fumadores. Las funciones biológicas del AA están relacionadas a su alto poder reductor actuando principalmente como un antioxidante soluble en agua. El AA es un excelente captador de radicales libres que neutraliza especies como el H_2O_2 , O_2^- y ácido hipocloroso (Xammar Oro, 2005). Su poder reductor está vinculado a la prevención de enfermedades asociadas al envejecimiento del hombre como son las cardiovasculares, cáncer, declive del sistema inmunitario y las degenerativas del sistema nervioso, tales como Parkinson y Alzheimer (Oro y Donnamaría, 2006). Además es un cofactor para las enzimas involucradas en la biosíntesis del colágeno, carnitina y neurotransmisores (IOM, 2000).

En nuestro país, de acuerdo a datos relevados por el Centro de Estudios Sobre Nutrición Infantil (CESNI) en el año 2007, sobre un total de 1.434 niños entre 6 y 13 años de las principales ciudades de Argentina, el 49% no cubre las recomendaciones de ingesta diaria de vitamina C debido al bajo consumo de frutas y vegetales, fuente principal de ingreso de esta vitamina al organismo.

Un alimento fortificado es una opción tecnológica para suplementar la ingesta diaria necesaria de aquellos nutrientes considerados esenciales. Estos alimentos contienen una proporción de vitamina superior al

contenido natural medio del mismo, ya que han sido fortificados. Sin embargo, en cada nuevo alimento fortificado que se genera surgen dificultades tecnológicas y comerciales, principalmente aquellas relacionadas a la aceptabilidad y estabilidad del mismo (Yazici et al., 1997). La concentración de la vitamina C en el alimento puede ser reducida en condiciones aeróbicas o anaeróbicas (Tannenbaum, 1976) debido a diferentes factores: temperatura, pH, exposición a la luz o presencia de iones metálicos. Sin embargo, la vía oxidativa tiende a predominar operando a mayores velocidades.

Debido a la importancia de la vitamina C para el hombre y a que su estabilidad está afectada por diferentes factores, se pretende evaluar la cinética de degradación en un caramelo de gelatina fortificado con AA.

Existen antecedentes de estudios de estabilidad de vitamina C realizados en varios tipos de productos como jugos cítricos, yerba mate y rosa mosqueta, pero en la actualidad no hay antecedentes en la industria de la golosinas.

Avances en materiales de empaque y técnicas de producción han incrementado las opciones de estructuras de materiales disponibles para la fabricación de envases plásticos. Estas alternativas de materiales poseen diferentes valores de permeabilidades a los gases, principalmente al oxígeno, permitiendo controlar la calidad y prolongar la vida útil de los alimentos (Persis Subramaniam, 2007).

Asegurar la concentración de ácido ascórbico durante un lapso razonable de tiempo permitirá generar una golosina como alimento fortificado que suplemente las carencias nutricionales.

Controlando la permeabilidad del material de empaque al oxígeno en condiciones normales de temperatura y humedad, se puede minimizar la pérdida de Vitamina C en los caramelos de gelatina fortificados.

CAPÍTULO N° 4: OBJETIVOS

4.1 Objetivos generales

El objetivo de este trabajo es estudiar la cinética de degradación del AA en caramelos a base de gelatina en función del tipo material de empaque elegido en condiciones normales de almacenamiento.

4.2 Objetivos específicos

1. Adaptación de una técnica para la determinación de vitamina C en caramelos, factible de aplicar en los laboratorios de control de calidad de Arcor SAIC.
2. Seleccionar la estructura de material de empaque óptimo, que permita obtener la mayor vida útil y el menor costo del producto final.

CAPÍTULO 5: MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Tipo de estudio

El presente trabajo de estudio es experimental – prospectivo.

5.2 Materiales

a) Caramelo

En el presente trabajo se utiliza un caramelo a base de gelatina fortificado con vitamina C, elaborado por Candy S.A. empresa del Grupo Arcor SAIC, de acuerdo a los procedimientos estandarizados de producción industrial con la eliminación del colorante para evitar interferencias en la detección del punto final de la titulación.

El caramelo es formulado con los siguientes ingredientes: jugo concentrado de naranja, jarabe de glucosa, azúcar, gelatina, almidón de maíz, ácido cítrico, ácido ascórbico, pectina, alfa-tocoferol acetato (vitamina E) y aromatizantes. El producto es formulado con jugo natural de fruta para cumplir con las disposiciones del CAA.

La cantidad de producto elaborado fue un lote de 380 kg a partir de 10 cargas iguales y consecutivas de 38 kg de jarabe cocinado acidulado. El jarabe posteriormente es depositado en moldes de almidón y mantenido en cámara hasta alcanzar los valores de grados Brix especificados para el desmolde. Debido al proceso productivo y su escala industrial, las 10 cargas constituyen el lote mínimo factible de depositar. A continuación, la producción ingresa al tambor rotativo de brillado y aceitado y finalmente se envasa. Las propiedades físico-químicas del producto final se pueden observar en la tabla N° VI y las técnicas desarrolladas se pueden consultar en los Anexos II y III:

Tabla N° VI. Propiedades físico-químicas del caramelo de gelatina

Parámetro	Valor	Método	Equipo
pH	3,39	Volumétrico	Titrande 835 Metrohm
Acidez	1,1 – 1,2	Potenciométrico	Titrande 835 Metrohm
Humedad (%)	22,0 +/- 1,0	Refractometría	Refractómetro Reichert Abbe Mark III

b) Envases

Los materiales de empaques seleccionados para la realización del trabajo fueron suministrados por Converflex S.A.. A continuación se detalla cada opción:

1. Bilaminado de polietilentereftalato (PET) sin cloruro de polivinilideno (PVDC) y polietileno blanco de baja densidad.
2. Bilaminado de polietilentereftalato (PET) con cloruro de polivinilideno (PVDC) y polietileno blanco de baja densidad.
3. Bilaminado de polipropileno biorientado y polietileno blanco de baja densidad.

Las características de cada polímero, sus propiedades de barrera al oxígeno, vapor de agua y costos de las distintas alternativas propuestas se detallan en la tabla N° VII. Se calcula el costo por envase para cada una de las alternativas considerándose como referencia la opción 3, por ser la de menor valor económico. La opción 1 tiene un valor 3% por encima de la referencia y la opción 2 un 13%.

Tabla N° VII. Propiedades de barrera de las diferentes alternativas de materiales de empaque y costos. Fuente Converflex SA

Alternativa	Láminas (A+B)		Permeabilidad al Oxígeno (cm ³ /m ² / día)	Permeabilidad al Vapor de Agua (g/m ² / día)	Costo Relativo base alternativa 3
	A	B			
1	12 mic PET sin PVDC	50 mic Polietileno Blanco	100	10	3%
2	12 mic PET con PVDC	50 mic Polietileno Blanco	10	5	13%
3	20 mic Polipropileno	50 mic Polietileno Blanco	2.100	5	
Condiciones de Medición			ASTM D 3985	ASTM E 96	

c) Envasado

El producto se envasa con cada una de las alternativas elegidas en la planta productora utilizando una envasadora vertical, ver figura N° 18. Se corrobora la integridad y hermeticidad del envase siguiendo los procedimientos estándares, los cuales están bajo convenio de confidencialidad, motivo por el cual no pueden ser descriptos en este trabajo.



Figura N° 19. Envase de tres costuras con indicación de las zonas de sellado.

5.3 Muestreo y frecuencia de análisis

Posteriormente se toma una muestra representativa de acuerdo al criterio de calidad definido por planta; Norma IRAM N°15. Para este ensayo 20 kg por envase a analizar.

Los diferentes sistemas envase/producto son almacenados en un ambiente de condiciones normales de temperatura y humedad (25 °C y 50% HR) por un período de 12 meses mantenido en su envase final una caja de cartón corrugado.

Las determinaciones se realizan los siguientes días posteriores al envasado 0, 7, 15, 30, 45, 54, 80, 113, 157, 191, 231 y 375.

5.4 Facilidades disponibles

El análisis de las muestras se realizó en el Laboratorio Central Golosinas, Arroyito Córdoba. Ver anexo I.

5.5 Determinación de la concentración del AA

La determinación del AA se puede realizar aplicando alguna de las siguientes técnicas: cromatografía por HPLC o determinación volumétrica. Para realizar este estudio se decide utilizar la técnica de determinación volumétrica del AA, debido a los recursos disponibles en planta.

a) Fundamento

La determinación del AA se realiza mediante la titulación de las muestras con el 2,6 dicloroindofenol, AOAC Método Oficial 967.21. El AA reduce la reacción de oxido-reducción del indicador 2,6 dicloroindofenol a una solución incolora. El punto final de la titulación es determinado por la aparición de una tonalidad rosa, en solución ácida, correspondiente a un exceso del indicador no reducido una vez que se ha oxidado toda la vitamina. La cantidad de vitamina C es determinada cuantitativamente mediante el consumo del dicloroindofenol previamente estandarizada por titulación contra una solución de AA de concentración conocida. Ver figura N° 19 y N° 20.

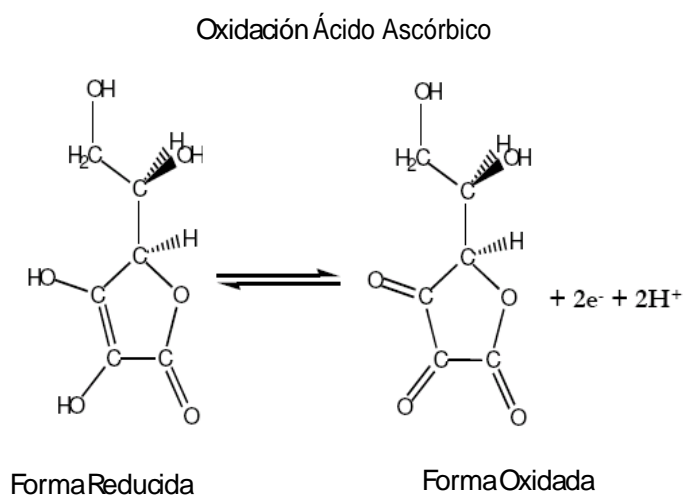


Figura N° 19. Oxidación del ácido ascórbico

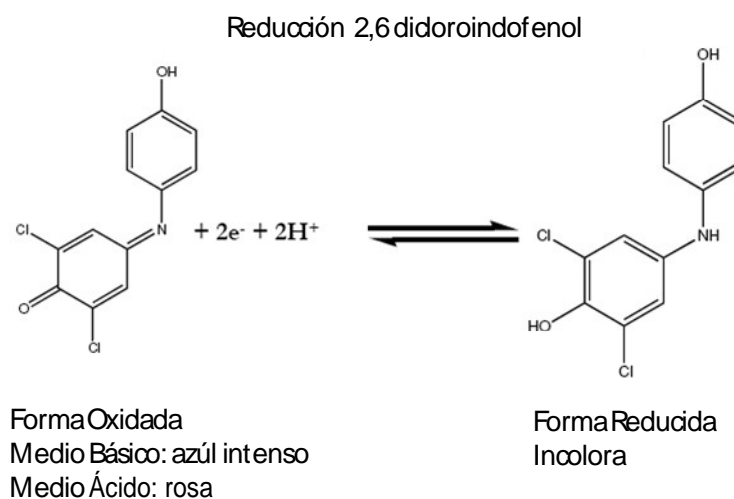


Figura N° 20. Reducción del 2,6-dicloroindofenol

b) Equipamiento

- Peachímetro: Marca *Thermo Scientific*
- Balanza: Marca OHAUS – Modelo Explorer

El listado completo del equipamiento e instrumental se lista en el Anexo I.

c) Reactivos para la determinación de AA

- Ácido Metafosfórico pa. según ACS env x 500 g. Marca Fisher A280-500 (UN1759-CL8).
- Diclorofenolindofenol sal sódica en 10g. Marca Acros 15287-0100.
- Ácido ascórbico min. 99% RA x 250 g. Marca Anedra artículo 6019.

El resto de los reactivos químicos y solventes empleados fueron de grado analítico.

d) Soluciones

Solución extractora (A1). Solución de ácido metafosfórico-ácido acético. Disolver mediante agitación 15 g de ácido metafosfórico (HPO_3)

recientemente pulverizadas en 40 ml ácido acético (CH_3COOH) y 200 ml de agua, llevar a 500 ml de volumen final y filtrar rápidamente a través de filtro de papel dentro de un envase de cristal con tapa. Mantener bajo refrigeración y utilizar dentro de los 7 días posteriores a su preparación.

Solución ácido metafosfórico-ácido acético-ácido sulfúrico (A2). Preparar esta solución de la misma manera que la solución A1 pero reemplazar el H_2O por 0,15 M H_2SO_4 .

Solución estándar de vitamina C (1 mg/ml). Pesar exactamente 50 mg de ácido ascórbico estándar que ha sido mantenido en un desecador alejado de una fuente lumínica. Colocar la vitamina en un matraz y enraizar a 50 ml con la solución A1.

Solución estándar de indofenol. Disolver 50 mg de la sal sódica 2,6-dicloroindofenol, mantenido en un desecador, en 50 ml de agua a la cual se agregó previamente 42 mg NaHCO_3 , agitar vigorosamente hasta disolución y llevar a un volumen final de 200 ml con agua. Filtrar a través de papel y mantener dentro de botella color ámbar con tapa esmerilada. Mantener tapada, alejada de la luz y bajo refrigeración. Para corroborar la eficacia del indofenol, agregar 5 ml de la solución A1 conteniendo exceso ácido ascórbico a 15 ml de la tinta reactiva, la solución resultante debe ser incolora.

e) Valoración del estándar de indofenol

Valorar el estándar de indofenol mediante la titulación de tres alícuotas de 2,0 ml de solución estándar de vitamina C en erlenmeyers de 50 ml conteniendo 5 ml de solución A1. Titular con solución de indofenol desde una bureta de 50 ml hasta que un leve y distintivo color rosado persista por más de 5 seg. (cada titulación requiere 15 ml solución de indofenol y las titulaciones no deben variar en más de 0,1 ml). Titular en forma similar 3 blancos compuesto de 7 ml de solución A1 más el volumen de agua igual equivalente al volumen de indofenol gastado en la titulación directa. Obtener el promedio de los blancos, calcular la concentración de

indofenol como mg ácido ascórbico equivalente a 1,0 ml de reactivo estándar de indofenol. Estandarizar en cada análisis.

f) Preparación de la muestra

Para cada una de las alternativas de material a ensayar tomar por triplicado 10 g de producto a partir de diferentes bolsas. Fraccionar la muestra con tijera y colocar la misma en vaso precipitado con 50 ml de agua destilada a 60 °C hasta disolución mediante agitación. Registrar el peso de la muestra (E).

Una vez disuelto y a temperatura ambiente, llevar a un volumen final de 100 ml con agua destilada (volumen como V1 en mililitros).

g) Sustancias de interferencia

Corroborar la ausencia de iones Fe, Sn, Cu, SO₂, sulfito o tiosulfato mediante 2 gotas de 0,05% de solución acuosa de azul de metileno en 10 ml de una mezcla recién preparada 1:1 de la solución a ensayar y el reactivo A1. Si el color de azul metileno desaparece en 5-10 segundos indica la presencia de sustancia de interferencia. La presencia de estos iones origina un exceso del contenido de vitamina C en este método. Evaluar el estaño de la siguiente manera, tomar 10 ml de la solución a ensayar con 10 ml HCL (1:3), colocar 5 gotas de solución acuosa de índigo carmine al 0,05% y mezclar. Si el color desaparece en 5 a 10 segundos indica la presencia de estaño u otra sustancia de interferencia.

h) Determinación

Tomar 2,0 ml de la solución de la muestra con 5 ml de solución A1, ajustar el pH con la solución A2 hasta pH menor a 1,2. Luego valorar con solución estándar indofenol (Vm).

Titular con indofenol 3 blancos compuesto de 7 ml de solución A1 más el volumen de A2 gastado para el ajuste de pH y un volumen de agua igual al volumen de indofenol gastado en la titulación de la muestra (Bm).

$$AA \text{ (mg/g)} = (V_m - B_m) \times (F/E) \times (V/Y)$$

Donde:

V_m : volumen gastado (ml) de la solución indofenol para la muestra

B_m : promedio (ml) de la titulación del blanco

F : mg ácido ascórbico equivalente a 1,0 ml solución estándar de indofenol (mg/ml).

E : gramos de la muestra inicial (g).

V : volumen inicial de la muestra (ml). Corresponde a los 100 ml de muestra

Y : volumen solución de ensayo titulada (ml). Corresponde a los 2 ml de alícuota.

Los resultados de cada determinación corresponden al promedio de las tres muestras evaluadas.

Los parámetros de la ecuación de degradación se calculan utilizando ecuaciones estándares de primer orden y primer orden reversible respectivamente:

Primer Orden: $\ln C_{AA} = \ln C_{AA0} - kt$

Primer Orden Reversible: $\ln (C_{AA} - C_{AA\infty}) = \ln (C_{AA0} - C_{AA\infty}) - kt$

Donde:

C_{AA} : concentración AA

C_{AA0} : concentración AA inicial

$C_{AA\infty}$: concentración AA a tiempo infinito

k : constante de velocidad

t : tiempo

Los resultados obtenidos se expresan en un gráfico representado la concentración de AA (mg/100g) vs tiempo.

Para los cálculos se utiliza el software Microsoft Excel 2007. Los análisis de regresión son calculados según el método de los mínimos cuadrados.

CAPÍTULO N° 6: RESULTADOS

Los resultados de las determinaciones expresados en mg de AA por 100 g de producto se detallan en el anexo N° IV.

En la figura N° 21 se grafican las determinaciones de la concentración de AA a lo largo del período de estudio para los tres tipos de envases propuestos. A partir de los resultados, se observó la degradación del contenido de ácido ascórbico producido en las diferentes opciones de material durante el almacenamiento. Se observa una caída más pronunciada de la concentración del nutriente en los primeros 50 días posteriores al envasado y luego la curva sigue una tendencia asintótica que se mantiene en los tres tipos de envases.

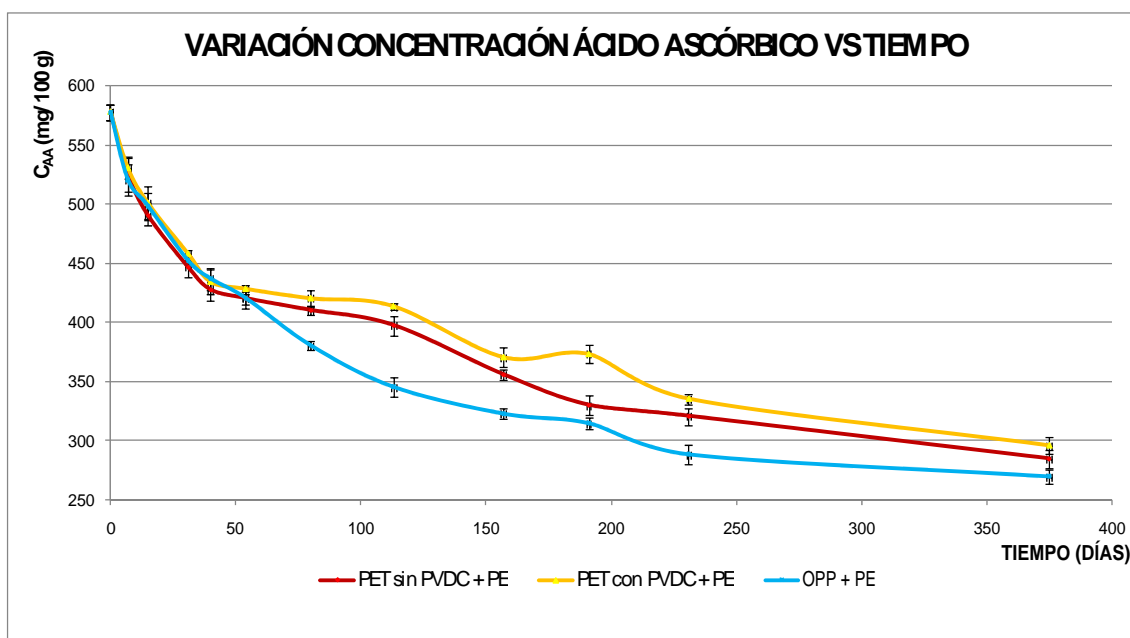


Figura N° 21. Evolución del contenido de ácido ascórbico C_{AA} (mg/100 g) en función del tiempo (días).

Se observa una reducción de la concentración de la vitamina C en un 51% para la opción PET sin PVDC + PE, un 49% para el PET con PVDC

+ PE y un 53% del OPP+PE comparado contra la concentración inicial al final del estudio.

Además, se puede observar a partir del gráfico C_{AA} en función del tiempo, que no hay marcadas diferencias entre las muestras analizadas. Un punto importante a considerar es que el pH del producto es muy cercano al pK1 4,04 del AA a 25 °C, donde se evidencia una mayor tasa de oxidación.

Los valores de la constante de velocidad para una cinética de primer orden hasta los 50 días y los correspondientes para la cinética reversible de primer orden al final del ensayo (365 días) se observan en la tabla N° VIII:

Tabla N° VIII. Cinética de la degradación del AA con su correspondiente constante de velocidad

CINÉTICA	ALTERNATIVA	MATERIAL	K	R ²
Primer orden (hasta 50 días)	1	PET sin PVDC + PE	0,0072 +/- 0,0001	0,9645
	2	PET con PVDC + PE	0,0068 +/- 0,0001	0,9773
	3	OPP + PE	0,0066 +/- 0,0000	0,9538
Primer orden reversible (365 días)	1	PET sin PVDC + PE	0,0082 +/- 0,0002	0,9633
	2	PET con PVDC + PE	0,0069 +/- 0,0002	0,9241
	3	OPP + PE	0,0108 +/- 0,0002	0,9819

En la figura N° 22 se grafica el $\ln(C_{AA})$ vs tiempo, donde se evidencia la cinética de primer orden para los primeros 50 días de almacenamiento del producto.

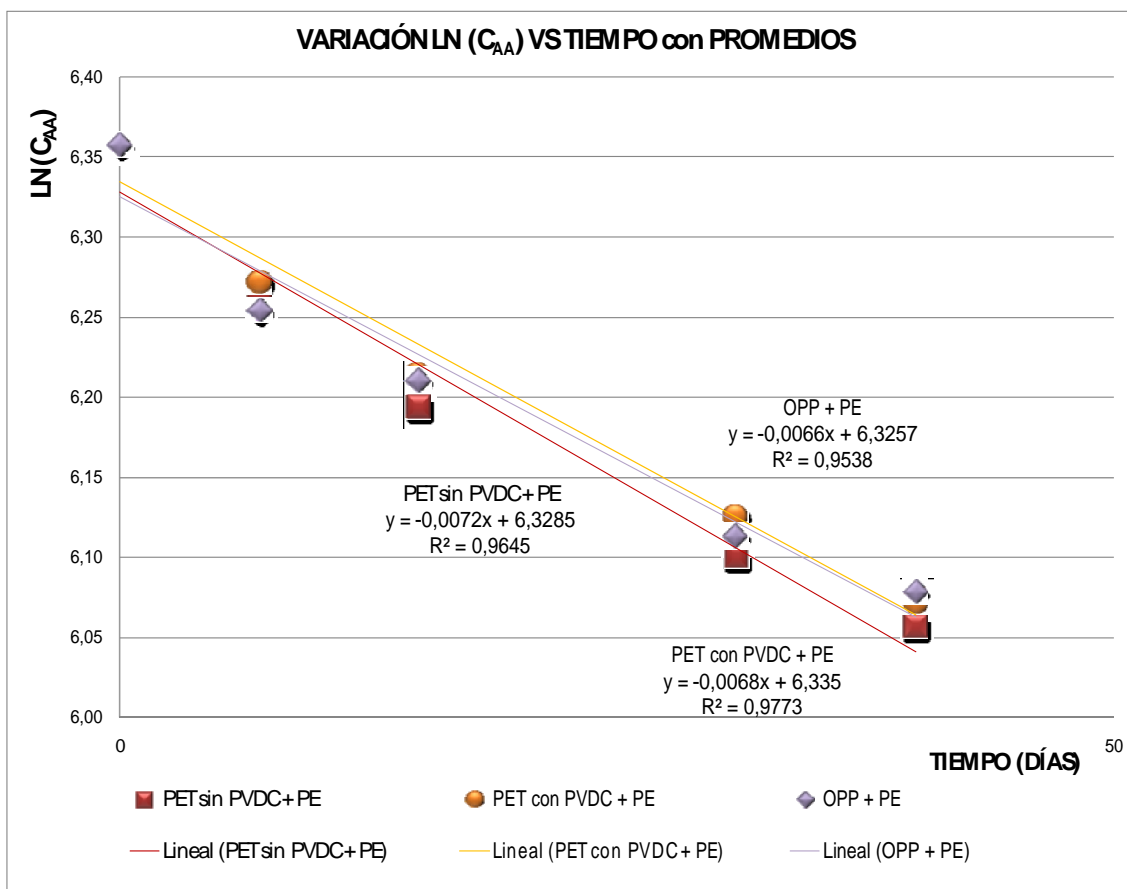


Figura N° 22. Variación del $\text{Ln}(C_{AA})$ vs tiempo durante los primeros 50 días

Sin embargo, considerando los 365 días de almacenamiento necesarios para cumplir con la vida útil del producto, se registra una cinética reversible de primer orden. En la figura N° 23 se grafica el $\text{Ln}(C_{AA}-C_{AA\infty})$ vs tiempo.

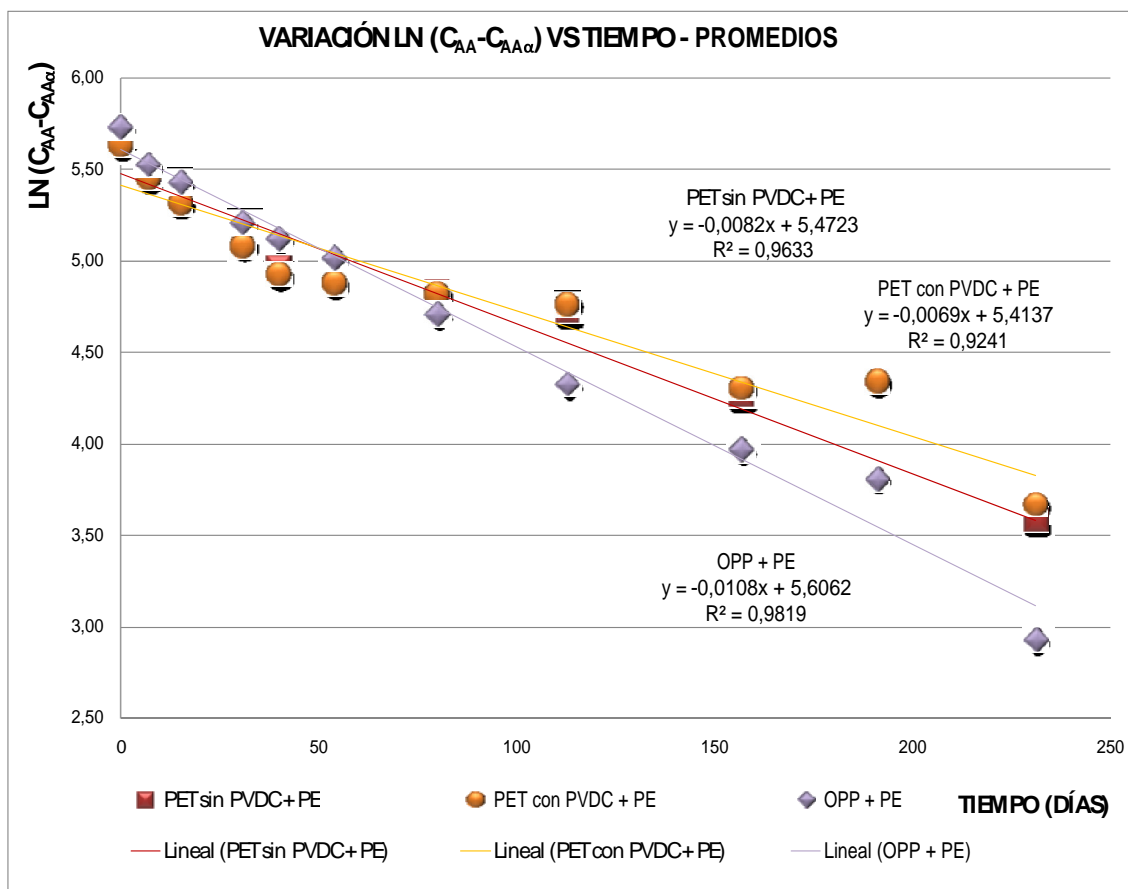


Figura N° 23. Variación del Ln ($C_{AA}-C_{AA\infty}$) vs tiempo durante los 365 días

CAPÍTULO N° 7: DISCUSIÓN

Los resultados en este trabajo de investigación evidencian una degradación de la concentración del AA en el caramelo de gelatina con el paso del tiempo. Como se observa en la figura N° 21 la disminución de la concentración del AA es más pronunciada en los primeros 50 días posteriores al envasado del producto. Los tres materiales respetan la misma tendencia en la curva de degradación sin marcadas diferencias en la concentración final de AA. Esto se puede deber a la disponibilidad de oxígeno en el ambiente interior del envase, y que rodea al alimento, hasta que éste prácticamente es consumido en su totalidad (Vieira et al., 2000).

La degradación evidenciada es del tipo oxidativa, presentando una cinética reversible de primer orden entre los 50 y los 365 días del estudio, definidos como el período de aptitud del producto. Este resultado evidenciaría la propiedad de barrera ejercida por los envases utilizados, impidiendo la disponibilidad de oxígeno para la reacción de oxidación del AA. Este comportamiento está alineado a los resultados obtenidos por Vieira y colaboradores sobre el néctar de Cupuaçu, tanto en la cinética de reacción como en el período de tiempo (Berlinet et al., 2006), evidenciando la cinética de primer orden dentro de los dos primeros meses de ensayo y una cinética de primer orden reversible desde los dos meses hasta el final del ensayo.

La concentración del AA al finalizar el estudio arroja un valor aproximado al 50% de su concentración inicial. Se podría decir que este valor tiende a estabilizarse con el paso del tiempo, debido al comportamiento de la curva de degradación en cada uno de los casos estudiados. Un caso similar fue evidenciado por Baiano et al. (2004) en la oxidación del AA en un jugo cítrico envasado en diferentes opciones de empaque, donde se justifica el comportamiento de equilibrio asociado a un agotamiento del oxígeno contenido en el envase.

La utilización de diferentes polímeros en el envasado del producto con marcadas diferencias en las permeabilidades al oxígeno, no han permitido evidenciar diferencias entre las opciones propuestas. A raíz de este comportamiento, se asume que la degradación ha sido generada por el oxígeno presente en el interior del envase al momento del envasado. Se podría eliminar el oxígeno en su totalidad mediante la aplicación de vacío o generación de una atmósfera modificada pero la tecnología actual disponible en planta no permite su aplicación.

El pH del producto en estudio presenta un valor similar al pK_{a1} : 4,04 a 25°C del AA, lo cual favorece la oxidación (Blaug y Hajratwala, 1972).

CAPÍTULO N° 8: CONCLUSIÓN

Se evidencia una degradación continua de la concentración de AA a lo largo del tiempo con una estabilización de la concentración a partir de los 50 días posteriores al envasado, evidenciándose la influencia del material de empaque como barrera impidiendo la disponibilidad de oxígeno para que continúe la reacción de oxidación. En este punto, se recomiendan estudios posteriores al presente trabajo para establecer los posibles mecanismos de degradación que podrían estar ocurriendo conjuntamente con el mecanismo oxidativo del AA.

Debido a la degradación evidenciada en el contenido de AA con el paso del tiempo, se concluye que es factible formular un caramelo de gelatina fortificado con vitamina C, siempre y cuando se lo formule inicialmente con una concentración mayor a la requerida, de manera tal que luego de dicha degradación, el producto siga cumpliendo con las legislaciones alimentarias correspondientes. La cantidad inicial de AA debe ser el doble de la concentración declarada como mínima en el rótulo del envase y de esta manera se cumple con el CAA y la FDA en cuanto a la ingesta diaria requerida (CAA, MERCOSUR/GMC/RES. N° 46/03 y FDA 21CFR 104). Un factor a tener en cuenta en el desarrollo del producto es el umbral límite recomendado de consumo de esta vitamina, cuyo valor de consumo diario máximo es de 2 g para adultos y de 650 mg en niños (IOM, 2000). El producto ensayado contiene el 200% de lo exigido por FDA por porción, aportando 120 mg, esto asegura su inocuidad para el consumidor debido a su característica hidrosoluble cuyo exceso se elimina por la orina.

Las estructuras ensayadas se diferencian entre sí por sus propiedades de barrera al oxígeno, sin embargo, este trabajo demuestra que no se presentan diferencias en los resultados de concentración final de AA en los tres tipos de empaques. Por lo tanto la recomendación es utilizar la alternativa OPP+PE, debido a que entre las opciones estudiadas

es la de menor costo. A partir de este estudio se recomienda el desarrollo y la investigación de envases denominados inteligentes, debido al contenido en su estructura de agentes secuestrantes del oxígeno, que limitan su ingreso al interior del envase. A nivel industrial se recomienda la implementación de sistemas de envasados provistos de atmósfera modificada reemplazando el oxígeno por un gas inerte.

La técnica analítica puesta en práctica en el presente estudio, está basada en la técnica 967.21 de la AOAC y es en su totalidad replicable en los laboratorios de control de calidad de la División Golosinas de la empresa. El instrumental requerido se encuentra disponible en cada planta productora. Esta técnica puede ser adaptada por las autoridades de control para cuantificar AA en caramelos.

BIBLIOGRAFÍA

- Alvarado J.D. y Viteri N.P. 1989. Efecto de la temperatura sobre la degradación aeróbica de vitamina C en jugos de frutas cítricas. Archivos Latinoamericanos de Nutrición 39:601-612.
- AOAC Official Method 967.21 Ascorbic Acid in Vitamin Preparations and Juices. 2,6 Dichloroindophenol Titrimetric Method. 2000 AOAC INTERNATIONAL.
- ASTM D 3985 – 95: Standard test method for Oxygen Gas Transmission Rate through plastic film and sheeting using a coulometric sensor.
- ASTM F 1249 -01: Standard test method for Water Vapor Transmission Rate through plastic film and sheeting using a modulated infrared sensor.
- Avello M y Suwalsky M. 2006. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. Atenea 494 II Sem. p. 161-172.
- Baiano A., Marchitelli V., Tamagnone P. and Del Nobile M.A. 2004. Use of Active Packaging for Increasing Ascorbic Acid Retention in Food Beverages. Journal of Food Science 69 (9):502-508.
- Berlinet C., Brat P., Brillouet JM., Ducruet V. 2006. Ascorbic acid, aroma compounds and browning of orange juices related to PET packaging materials and pH. Journal of the Science of Food and Agriculture 86:2206-2212.
- Berry Ottaway P. 1993. The Technology of Vitamins in Food – Springer; 1st edition 7:143-147.

- Blaug S.M., Hajratwala B. 1972. Kinetics of aerobic oxidation of ascorbic acid. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 61(4):556.
- Brien O., Robertson D. 1993. In Berry Ottaway P. *The Technology of Vitamins in Food* Springer; 1st edition (6):114-119.
- Buettner G.R. 1993. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alphotocopherol, and ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 300:535-543.
- Centro de Estudios Sobre Nutrición Infantil (CESNI), 2007. Evaluación nutricional del producto Yahoo® y recomendaciones con respecto a la adición de nutrientes y niveles de fortificación. p. 1-13.
- Chatterjee I.B. 1978 Ascorbic acid metabolism. *World Review of Nutrition and Dietetics* 30:69-87.
- Cheftel J., Besançon P. y Cheftel H. 1992. Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos. Volumen II. Editorial Acribia, Zaragoza. p. 309-325
- Código Alimentario Argentino (CAA), 2003. MERCOSUR/GMC/RES. N° 46/03, REGLAMENTO TÉCNICO MERCOSUR SOBRE EL ROTULADO NUTRICIONAL DE ALIMENTOS ENVASADOS, anexo A.
- CAA, 2008. Capítulo XVII, artículo 1363 – (resolución conjunta SPy RS y SAGPyA N° 118/2008 y N° 474/2008).
- Comunidad Europea, Directiva 90/496/CEE del Consejo, de 24 de septiembre de 1990, relativa al etiquetado sobre propiedades nutritivas de los productos alimenticios. *Diario Oficial* n° L 276 de 06/10/1990 p. 0040 – 0044.
- Conrad K.R. 2002. Light degradation of juices packaged in polyester bottles. University of Guelph. Ontario, Canada. National Library of Canada, Ottawa, Ontario, Canada p. 130.

- Conrad K.R., Davidson V.J., Muholland L., Britt I.J. and Yada S. 2005. Influence of PET and PET/PEN Blend Packaging on Ascorbic Acid and Color in Juices Exposed to Fluorescent and UV Light. *Journal of Food Science* 70(1):E16-E25.
- Curnutte, J.T., Babior, B.M. 1987. Chronic granulomatous disease. *Adv Hum Genet* 16:229-297.
- Dresch G., Benitez J., Ramallo L.A. 2004. Degradación del ácido ascórbico en yerba mate. Facultad de Ciencia Exactas, Químicas y Naturales – Universidad de Misiones. Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Posadas, Misiones. Año 2004.
- DSM Nutritional Products Ltd. 2007. Vitamin Basic. The facts about Vitamins in Nutrition. p. 38-44.
- Fagali N. 2011. Peroxidación de diferentes especies lipídicas: Efecto de Antioxidantes. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de la Plata Facultad de Ciencias Exactas. p. 24-50.
- FDA 2011. Code of Federal Regulations. Title 21 Food and Drug, Volume 2. 21CFR104.20.
- Fennema O.R. 2010. Química de los Alimentos. Editorial Acribia, Zaragoza, España 3ª Edición.
- ILSI 1996. Antioxidants Scientific basic, Regulatory aspects and industry perspectives. Summary of a Workshop held in February 1996 - Organised by ILSI Europe Antioxidant Task Force. <http://www.ilsi.org>. Consultado en fecha: 23 Octubre 2011.
- ILSI 2004. Conceptos sobre alimentos funcionales por Margaret Ashwell. <http://www.ilsi.org>. Consultado en fecha: 18 Octubre 2007.

- Institute of Medicine 2000. Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. Washington, DC: The National Academy of Sciences. 5:95-166.
- Johnson J.R., Braddock R.J., Chen C.S. 1995. Kinetics of ascorbic acid loss and non-enzimatic browning in orange juice serum: Experimental rate constants. *Journal Food Science* 60(3):502-505.
- Kumins C.A. 1965. Transport through polymers films. *Journal of Polymer Science* 10:1-9.
- Laing B.M., Schlueter D.L., Labuza T.P. 1978. Degradation kinetics of ascorbic acid at high temperature and water activity. *Journal of Food Science* 43:1440-1443.
- Langseth L. 1995. Oxidants, Antioxidants, and Disease Prevention. International Life Sciences Institute Europe (ILSI). <http://www.ilsi.org>. Consultado en fecha: 23 Octubre 2011.
- Levine M., Rumsey S., Daruwala R., Park J., Wan Y. 1999. Criteria and Recommendations for Vitamin C Intake. *Jama* 281(15):1415-1423.
- Miller K.S., Krochta J.M. 1997. Oxygen and aroma barrier properties of edible films: a review. *Trends in Food Science and Technology*. 8(7):228.
- Oro Xammar J. R. D. y Donnamaría M. C. 2006 Acción Farmacológica, Biofisiológica y Estructura Dinámica de la Vitamina C. *Acta Farmacéutica Bonaerense* 25 (1):145-54.
- Paine F.A., Paine H.Y. 1983. A handbook of food packaging. Blackie Academic and Professional. London, U.K. p. 296-339.

- Pascat B. 1986. Study of some factors affecting permeability. In Food Packaging and Preservation. Theory and Practice. Elsevier Applied Science Publishers, London. p. 7-24.
- Persis Subramaniam, 2007 – Determining Shelf Life of Confectionery Products – Leatherhead Food International. p. 85-91.
- Pirone B. N., Ochoa M. R., Kessler A. G., De Michelis, A. 2002. Evolución de la concentración de ácido ascórbico durante el proceso de deshidratación de frutos de la rosa mosqueta (*Rosa Eglanteria* L.) RIA. Revista de Investigaciones Agropecuarias 31(1): 85-98.
- Proffit P.J.G. 1994. Envasado de Alimentos conservados mediante calor en recipientes de plástico. En Procesado Térmico y Envasado de los Alimentos de Rees J.A.G y Bettison J., Editorial Acribia. Capitulo 7. p. 250-265.
- Richardson T.R., Finley J.W. 1985. Chemical Changes in Food During Processing. AVI Publishing Co. 17:385-387.
- Rice-Evan C., Arif S. 2002. Dietary Antioxidants and Nutrition in Reactive Oxygen Species in Biological Systems, Part IV: 367-393. DOI: 10.1007/0-306-46806-9_14
- Robertson L.M., Samaniego H.T. 1986. Effect of initial dissolved oxygen levels on the degradation of ascorbic acid and the browning of lemon juice during storage. Journal Food Science 51(1):184-187.
- Saguy I., Kopelman I.J. and Mizrahi S. 1979. Simulation of ascorbic acid stability during heat processing and concentration of grapefruit juice. Journal Food Process Engineering 2:213-225.
- Schlueter A.K., Johnston C. 2010. Vitamin C: Overview and Update. Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine 16(1): 49-57.

- Talasila P.C., Cameron A.C. 1997. Prediction equations for gases in flexible modified atmosphere packages of respiring produce are different than those for rigid packages. *Journal of Food Science* 62 (5):926–930.
- Tannenbaum S. 1976. Ascorbic acid chemistry. In Fennema, O. *Principles of Food Science. Part I. Food Chemistry* (2nd ed.). Marcel Dekker, New York. Chapter 7:477-544.
- Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry 2003. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GMBH. p. 218:231.
- Vieira M.C., Teixeira A.A., Silva C.L.M. 2000. Mathematical modeling of the thermal degradation kinetics of vitamin C in cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) nectar. Universidad Católica Portuguesa. <http://hdl.handle.net/10400.14/6912>. Consultado en fecha: 22 Febrero 2012.
- Welte-Chanes J., Vergara-Balderas F., Guerrero-Beltrán J.A., García Torres R. y Villas-Rojas R. 2005 Métodos, criterios y modelación para la selección de películas plásticas en atmósferas modificadas. Universidad de las Américas, Puebla México. Segundo Simposio Internacional de Innovación y Desarrollo de Alimentos, Innova, Montevideo, Uruguay, Septiembre 2005. p. 15.
- WHO/FAO (World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations) 2002. Human vitamin and mineral requirements. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation, Bangkok, Thailand.
- Yazici F., Alvarez V., Mangino M., Hansen P. 1997. Formulation and processing of a heat stable calcium-fortified soy milk. *Journal of Food Science*, 62(3):535-538.

- Zhou C., Huang Y., Przedborski S. 2008. Oxidative Stress in Parkinson's Disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1147:93–104. doi: 10.1196/annals.1427.023

ANEXO I: FACILIDADES DISPONIBLES

A continuación se detalla el instrumental y equipamiento necesario para la implementación de la técnica:

a) Equipamiento

- Peachímetro: Marca *Thermo Scientific*
- Balanza analítica: Marca OHAUS – Modelo Explorer
- Agitador magnético

b) Instrumental de laboratorio

- Mortero
- Desecador
- Vasos de Precipitado. Capacidad: 50 ml y 100 ml
- Probetas. Capacidad: 50 ml, 100 ml y 250 ml
- Embudo de vidrio y papel de filtro
- Varilla para agitación
- Matraces aforados. Capacidad 50 ml y 500 ml
- Pipetas. Capacidad 2 ml y 5 ml
- Espátulas
- Vidrio de reloj
- Buretas de 25 ml (con soporte y pinza)
- Tijera
- Termómetro

ANEXO II: TÉCNICA PARA LA DETERMINACIÓN DE pH Y ACIDEZ EN JARABES

1. Objetivo:

Establecer y mantener una metodología a utilizar para la determinación de pH y % de acidez en jarabes.

2. Descripción:

2.1 Principio:

En alimentos el grado de acidez indica el contenido en ácidos libres. Se determina mediante una valoración con un reactivo básico. El resultado se expresa como el porcentaje (%) del ácido predominante en el material. En el caso de los jarabes de glucosa se mide % de ácido cítrico.

La acidez de una sustancia se puede determinar por métodos volumétricos (Titulación).

A nivel industrial, se consideran dos tipos de acidez. Se tiene la acidez natural y la acidez desarrollada. La acidez natural se debe a la composición natural del alimento o sustancia. La acidez desarrollada se debe a la acidificación de la sustancia ya sea por procesos térmicos, enzimáticos o microbiológicos.

La que posee importancia en el aspecto tecnológico es la desarrollada. Ésta suele determinar la sanidad industrial de la sustancia para obtener productos secundarios.

2.2 Definición:

La acidez de una sustancia es el grado en el que es ácida. La acidez total se define como la totalidad de los ácidos volátiles y fijos que contiene la sustancia, expresada en gramos de ácido titulables por 100 ml de muestra. Es decir, que para determinar la acidez total de un jarabe hemos de obtener la proporción equivalente de ácido cítrico que contiene.

La determinación de la acidez total se realiza en la práctica en base a una valoración ácido-base, utilizando como reactivo valorante una base fuerte como es el hidróxido sódico, y tomando como punto de equivalencia $\text{pH} = 8,3$.

3. Instrumental:

- Equipo Titrande 835
- Vaso de precipitado 250 ml
- Varilla plástica
- Balanza electrónica, con sensibilidad de 0,001 g

4. Reactivos y soluciones:

Hidróxido de Sodio (NaOH) 0,5 N: se pesan 24,5 g de NaOH y se lleva a 1000 ml en un matraz aforado.

Solución para el electrodo Cloruro de Potasio (KCl) 3M, Biopack: se pesan 223 g de KCl y se llevan a 1000 ml en matraz aforado.

Buffer de pH 4,0 Merck: ácido cítrico, hidróxido de sodio y ácido clorhídrico.

Buffer de pH 7,0 Merck: di-sodio hidrogeno fosfato, y potasio dihidrógeno fosfato.

Las soluciones para el electrodo deben ser cambiadas semanalmente.

5. Preparación de la muestra:

Se toman 15 g de muestra de una pieza entera del producto a determinar en un vaso de precipitado y se agregan 150 ml de agua destilada. Se agita hasta obtener una solución homogénea. Es importante registrar el peso exacto de la muestra.

6. Procedimiento:

Se coloca la solución obtenida de la muestra con un imán en el titulador del Titrande. El pH es automáticamente medido. A continuación

se coloca el peso exacto de la muestra en el equipo en la opción *Sample Size* y presionar *START*. La solución es titulada en forma automática con hidróxido de sodio 0,5 N a un pH final de 8,3. Los resultados son calculados por el equipo y expresados como porcentaje de acidez titulable (ácido cítrico).

7. Cálculos:

7.1 La acidez titulable es calculada por la siguiente fórmula:

$$\text{Titulable (como Ácido Cítrico)} = \frac{Vg. \times 0.5 N \times 0.064 \times 100}{\text{Peso Muestra (g)}}$$

Referencia:

Vg.: Volumen gastado (ml)

0,5 N: Normalidad del Hidróxido de Sodio.

0,064: Factor del peso molecular del ácido cítrico.

8. Responsable:

El ensayo es realizado por los Analistas de Calidad. Los cuales conocen la presente técnica y la desarrollan en base a lo aquí descrito.

9. Registro de Datos:

Los datos de cada ensayo son cargados por el Analista que los realiza al SPAC (Sistema para el Aseguramiento de la Calidad) y en los Registros correspondientes. A continuación se detalla el instrumental y equipamiento necesario para la implementación de la técnica:

ANEXO III : TÉCNICA PARA LA DETERMINACIÓN DE HUMEDAD RELATIVA EN CARAMELOS

1. Objetivo:

Establecer y mantener una metodología a utilizar para la determinación de humedad relativa en caramelos.

2. Descripción:

2.1 Principio:

Para asegurar la calidad del producto final se deben cumplir ciertas especificaciones y controles de calidad. Uno de los controles de calidad más frecuentes que se llevan a cabo en la industria de los dulces es la determinación de grados Brix, los cuales nos permiten determinar la humedad del mismo.

2.2 Definición:

Los grados Brix miden la cantidad de sólidos solubles presentes en los jarabes y caramelos, expresados en porcentaje de sacarosa. Los sólidos solubles están compuestos por los azúcares, ácidos, sales y demás compuestos presentes solubles en agua. La determinación se realiza empleando refractómetros calibrados.

3. Instrumental:

- Equipo: Refractómetro Reichert Abbe Mark III
- Pincel
- Tijera

4. Preparación de la muestra:

La determinación de grados Brix se realiza al producto en proceso, en cámara o estufa dependiendo del producto, y al producto final.

4.1 Productos en proceso: el producto se encuentra depositado en los moldes de almidón por lo tanto es necesario eliminar el almidón superficial con un pincel.

4.2. Producto Terminado: los pasos a seguir son:

1- Seleccionar el caramelo. Es recomendable seleccionar el producto de color más claro para evitar interferencias en la lectura.

2- Eliminar el almidón de su superficie.



3- Con el uso de la tijera cortar el caramelo en su sección media y luego extraer una muestra lo más fina posible como lo demuestra la foto.



4- Colocar la muestra en el prisma del refractómetro cubriendo la totalidad de la superficie. Evitar el contacto de la zona central del caramelo para minimizar errores de lectura. Posteriormente se debe tapar el prisma con el cubre (tapa) y se realiza la lectura de los grados Brix.

5.1 Toma de Lectura:

El refractómetro Reichert Abbe Mark III, consta de un prisma donde se coloca la muestra, un cubre para tapar y presionar la misma contra el prisma. Finalmente el visor permite realizar la lectura a través de una

línea generada por el cambio de color de una zona más intensa a una más clara. La línea de cambio de color permite realizar la lectura contra la escala de grados Brix presente en el interior del equipo.



6. Cálculos:

En la determinación, el refractómetro Reichert Abbe Mark III debe estar en la opción de sucrosa % sólidos-TC para expresar los resultados en la escala de 1 °Brix. Se toma este valor y se saca por diferencia la humedad relativa del producto.

$$\% \text{ Humedad Relativa (HR): } 100 - ^\circ\text{Brix}$$

Donde:

100: concentración total de muestra, expresada en %

°Brix: concentración de sólidos solubles, expresado en % Sacarosa

6. Responsable:

El ensayo es realizado por los Analistas de Calidad. Los cuales conocen la presente técnica y la desarrollan en base a lo aquí descrito.

8. Registro de Datos:

Los datos de cada ensayo son cargados en el SPAC (Sistema Para el Aseguramiento de la Calidad) y en los Registro de liberación, teniendo en cuenta el estado del producto (estufa, cámara o producto final).

ANEXO IV: RESULTADOS DE LAS DETERMINACIONES DE AA

A continuación se expresan los resultados obtenidos en las determinaciones de AA expresados en mg por 100 g de producto (mg/100g).

Días	PET sin PVDC + PE			Promedio	Desviación Estándar
0	581	581	570	577	6
7	540	525	510	525	15
15	498	482	490	490	8
31	456	440	443	446	9
40	438	422	422	427	9
54	430	416	414	420	9
80	414	408	408	410	3
113	404	400	388	397	8
157	360	355	352	356	4
191	338	330	322	330	8
231	328	320	314	321	7
375	292	276	286	285	8

Días	PET con PVDC + PE			Promedio	Desviación Estándar
0	581	581	570	577	6
7	540	522	528	530	9
15	515	500	486	500	15
31	461	458	454	458	4
40	446	430	426	434	11
54	424	432	428	428	4
80	422	426	412	420	7
113	416	414	410	413	3
157	380	366	365	370	8
191	378	377	364	373	8
231	340	332	334	335	4
375	304	294	290	296	7

Días	OPP + PE			Promedio	Desviación Estándar
0	581	581	570	577	6
7	535	516	510	520	13
15	510	496	488	498	11
31	456	450	450	452	3
40	426	440	444	437	9
54	427	418	416	420	6
80	378	385	378	380	4
113	336	348	352	345	8
157	326	324	318	323	4
191	310	320	314	315	5
231	296	280	289	288	8
375	265	276	268	270	6

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.